

**ANALISA KEKERABATAN RUSA BAWEAN (*Axis kuhlii*) DI TAMAN SAFARI INDONESIA II PRIGEN  
BERDASARKAN SEKUEN GEN *CYT-B* DENGAN  
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION***

**SKRIPSI**

Oleh:

**SERUNI UMMI AZHIZALITA**

**145130101111004**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**ANALISA KEKERABATAN RUSA BAWEAN (*Axis kuhlii*) DI TAMAN SAFARI INDONESIA II PRIGEN  
BERDASARKAN SEKUEN GEN *CYT-B* DENGAN  
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION***

**SKRIPSI**

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh:

**SERUNI UMMI AZIIZALITA**

**145130101111004**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

# LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

## ANALISA KEKERABATAN RUSA BAWEAN (*Axis kuhlii*) DI TAMAN SAFARI INDONESIA II PRIGEN BERDASARKAN SEKUEN GEN *CYT-B* DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Oleh:

**SERUNI UMMI AZHIZALITA**

**145130101111004**

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji  
pada tanggal 19 September 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr.Ir.Gatot Ciptadi, DESS**  
NIP. 196005121987011001

**drh.Fajar Shodiq Permata,M.Biotech**  
NIP. 198705012015041001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Seruni Ummi Aziizalita  
NIM : 145130101111004  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul:

**Analisa Kekerabatan Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) di Taman Safari Indonesia II Prigen Berdasarkan Sekuen Gen *CYT-B* Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction***

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar – benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 19 September 2018  
Yang menyatakan,

(Seruni Ummi A.)  
NIM. 145130101111004

**Analisa Kekerabatan Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) di Taman Safari  
Indonesia II Prigen Berdasarkan Sekuen Gen *CYT-B* dengan  
Metode *Polymerase Chain Reaction***

**ABSTRAK**

Rusa Bawean adalah satwa endemik Indonesia yang memiliki status *critically endangered*. Penelitian tentang kekerabatan salah satunya menggunakan *marker* mtDNA dikarenakan sifat yang hanya diturunkan dari induk betina. Gen *Cyt-b* yang merupakan bagian dari mtDNA, baik digunakan untuk determinasi kekerabatan filogenetik pada berbagai spesies. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kekerabatan antar individu rusa Bawean dan sekaligus ingin mengetahui jarak genetik antara rusa Bawean dengan rusa Babi dari data NCBI menggunakan sekuen gen *Cyt-b*. DNA didapatkan dari sampel *wholeblood* rusa Bawean di Taman Safari Indonesia II Prigen. Sampel rusa Bawean di Taman Safari Indonesia II Prigen yang diambil berjumlah 4 ekor, dimana diambil dari 31 populasi rusa Bawean disana. Sampel *wholeblood* diisolasi DNA menggunakan *QIAamp® DNA Mini Kit*. Primer yang digunakan dalam metode PCR adalah primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GACAAAGCAACCTTAACCCG-3' dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-CGTTGTTTGGATGTGTGGAG-3'. Hasil PCR dilakukan sekuensing dengan metode *Sanger*. Hasil sekuensing dianalisa menggunakan program *Bioedit* dan NCBI BLAST dengan *accession number* HQ893538.1 untuk rusa Bawean dan MF435989.1 untuk rusa Babi. Hasil penelitian jarak genetik antara HQ893538.1 dengan keempat sampel rusa Bawean dan antar individu sampel rusa Bawean berada dibawah 2% dengan rentang 0,3-1,38%, dimana rentang tersebut untuk perbandingan pada mamalia. Jarak genetik interspesies antara rusa Babi (MF435989.1) dan keempat sampel rusa Bawean mendapatkan hasil berada di rentang 0,93-10,31%. *Sequence diversity* intraspesies pada sampel rusa Bawean berada pada rentang 0,25-2,74% rentang tersebut didapatkan dari penelitian sebelumnya pada rusa Sambar, dan interspesies antara sampel rusa Bawean dengan rusa Babi (MF435989.1) berada dibawah standar reverensi yaitu dibawah 5,97%. Kesimpulan penelitian ini, jarak genetik intraspesies keempat rusa Bawean Taman Safari Indonesia II Prigen berada dibawah 2%. Berdasarkan jarak genetik interspesies dan posisi pohon filogenetik, rusa Bawean TSI berbeda kekerabatan dengan rusa Babi.

Kata kunci : Rusa Bawean, mtDNA, *Cyt-b*, PCR

**Bawean Deer (*Axis kuhlii*) Genetic Relationship Analysis From  
Taman Safari Indonesia II Prigen Based on CYT-B Gen  
Sequence With *Polymerase Chain Reaction* Method**

**ABSTRACT**

Bawean deer are endemic species of Indonesia that have critically endangered status. Research on relationship often uses mtDNA markers because of the only inherited nature of the female parent. The Cyt-b gene, which is part of mtDNA, is best used for the determination of phylogenetic kinship in various species. This study aims is to determine the level of relationship between individuals Bawean deer and at the same time wanted to know the genetic distance between Bawean deer with Hog deer from NCBI data using Cyt-b gene sequence. DNA was obtained from a whole blood sample of Bawean deer which come from Taman Safari Indonesia II Prigen. The sample of Bawean deer in Taman Safari Indonesia II Prigen taken 4 individuals, which was taken from 31 population of Bawean deer there. The whole blood sample was isolated using QIAamp® DNA Mini Kit. The primary used in the PCR method is the forward-primer (CYTB\_F) 5'-GACAAAGCAACCTTAACCCG-3' and reverse primer (CYTB\_R) 5'-CGTTGTTTGGATGTGTGGAG-3'. PCR results are then sequenced using the Sanger method. The sequencing results were analyzed using Bioedit and NCBI BLAST program with accession number HQ893538.1 for Bawean deer and MF435989.1 for Hog deer. The results of the genetic distance study between HQ893538.1 with the four Bawean deer samples and between individual Bawean deer samples were below 2% with a range of 0.3 to 1.38% where the range is for comparison in mammals.. The genetic distance of interspecies between Hog deer (MF435989.1) and the four Bawean deer samples obtained results were in the range 0.93-10.31%. Sequence diversity of intraspecies on Bawean deer was in the range of 0.25-2.74% this range was obtained from previous research on Sambar deer, and the interspecies between Bawean deer sample with Deer (MF435989.1) were below the standard of reverence under 5.97%. In conclusion, the intraspecies genetic distance of the four Bawean deer of Taman Safari Indonesia II Prigen was below 2%. Based on the genetic distance of interspecies and phylogenetic tree positions, Bawean deer and Hog deer are distinct species.

**Keywords:** Bawean deer, mtDNA, Cyt-b, PCR



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas perkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Analisa Kekerabatan Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) di Taman Safari Indonesia II Prigen Berdasarkan Sekuen Gen *CYT-B* Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction***” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.Ir.Gatot Ciptadi, DESS., dan drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech sebagai dosen pembimbing atas bimbingan, nasihat, saran dan segala perhatian yang telah diberikan selama penyusunan skripsi ini.
2. Drh. Desi Wulansari, M.Vet., dan drh. Rahadi Swastomo, M.Biomed., sebagai dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran selama pelaksanaan ujian skripsi.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Drh. Nanang Tedjo Leksono dan Drh. Gilang Romadhon sebagai dokter hewan Taman Safari Indonesia II Prigen atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada penulis.
5. Keluarga penulis, Ayah Heru Mahendtara S., Ibunda Diana Sumaniar, dan Kakak Diandra Saginatari, Bimo Herpanjiadi, Adiarani Puspitaati, M. Bayu

Indratomo atas segala pengorbanan, doa, materi dan kasih sayang yang tak terhingga kepada penulis.

6. Keluarga besar Improve KELAWAR yang telah memberi masukan, dorongan, semangat, dan pengetahuan tentang satwa liar, teman sejawat yaitu Nur Jauharah Fitriani, Andi Citra Septaningsih, Ahmad Ikhwan, Rifqi Rahman, dan Dinul Hamdi yang telah memberi masukan, motivasi, dan semangat selama proses penulisan skripsi kepada penulis, drh. Muhammad Abdillah yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan selama menjalankan penelitian, adik Salsabila Widdhie A. sebagai adik yang selalu mengingatkan dan memberi semangat untuk cepat lulus, dan anggota kelas AMAZE yang telah menemani proses belajar selama 4 tahun masa pendidikan dokter hewan.
7. Teman istimewa penulis yaitu Idho Rizky Nur Cahyo, yang sudah sabar dan terus mendukung penulis.

Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis, dan semoga Skripsi ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca.

Malang, 19 September 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

### Halaman

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>..ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Rusa Bawean ( <i>Axis kuhlii</i> ) .....	7
2.2 Perbandingan Morfologi Rusa Bawean dengan Rusa Babi.....	11
2.3 DNA Mitokondria (mtDNA).....	13
2.4 Gen <i>Cyt-b</i> (Cytochrome B).....	15
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	16
2.6 Sekuensing DNA.....	18
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ...</b>	<b>21</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	21
3.2 Hipotesis Penelitian.....	24

<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>25</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	25
4.2 Pemilihan Sampel Rusa Bawean .....	25
4.3 Alat dan Bahan .....	26
4.4 Tahapan Penelitian .....	27
4.5 Rancangan Penelitian .....	29
4.6 Prosedur Kerja .....	30
4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Rusa Bawean .....	30
4.6.2 Isolasi DNA .....	30
4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA .....	32
4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA .....	32
4.6.3.2 Uji Kualitas DNA .....	32
4.6.4 Desain Primer .....	34
4.6.5 Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	35
4.6.6 Uji Kuantitas dan Kualitas Produk PCR .....	36
4.6.7 Sekuensing DNA .....	37
4.6.8 Analisa Data .....	38
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>39</b>
5.1 Isolasi DNA Rusa Bawean ( <i>Axis kuhlii</i> ) .....	39
5.2 Amplifikasi Gen <i>Cyt-b</i> dengan Metode PCR .....	41
5.3 Sekuensing Gen <i>Cyt-b</i> .....	44
5.4 Analisa Sekuen DNA Gen <i>Cyt-b</i> .....	46
5.5 Hubungan Kekerabatan Rusa Bawean ( <i>Axis kuhlii</i> ) Berdasarkan Pohon Filogenetik .....	48
<b>BAB 6. PENUTUP .....</b>	<b>55</b>
6.1 Kesimpulan .....	55
6.2 Saran .....	55
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>56</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>62</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 4.1 Data Informasi Individu Sampel Rusa Bawean.....	26
Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Rusa Bawean ( <i>Axis kuhlii</i> ).....	39
Tabel 5.2 Program PCR untuk Amplifikasi gen <i>Cyt-b</i> rusa Bawean .....	43
Tabel 5.3 <i>Query coverage</i> dan <i>identity</i> sampel terhadap genebank HQ893538.145	
Tabel 5.4 Jumlah perubahan basa terhadap referensi .....	46
Tabel 5.5 Presentasi Data Perhitungan Pairwise Distance. Jarak genetik (hitam) dan sequence diversity (biru).....	51



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
<b>Gambar 2.1 Rusa Bawean .....</b>	<b>8</b>
Gambar 2.2 Rusa Bawean (Kiri) dan Rusa Babi (Kanan).....	12
Gambar 2.3 Rusa Bawean (Kiri) dan Rusa Babi (Kanan).....	12
Gambar 2.4 DNA mitokondria.....	14
Gambar 2.5 Letak gen cytochrome b dalam DNA mitokondria .....	15
Gambar 2.6 Tahapan pada mesin PCR.....	18
Gambar 2.7 Skema sekuensing DNA metode Sanger.....	20
Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual .....	23
Gambar 4.1 Skema Tahapan Penelitian .....	28
Gambar 5.1 Hasil Isolat DNA total rusa Bawean Agarose 1% Keterangan : M : Marker 1 kb, A1: Abi, A2: Ani, A3: Aba, A4: Ana. Keempat sampel hasil isolasi menggunakan kit Qiagen menunjukkan pita lebih dari 10.000 bp.....	41
Gambar 5.2 Origin Oligo Nukleotida Gen Cyt-b, Keterangan : Biru: Primer forward Cyt-b, Kuning: Primer reverse Cyt-b.....	42
Gambar 5.3 Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 2% Keterangan : M: Marker 100 bp, A1: Abi, A2: Ani, A3: Aba, A4: Ana.....	43
Gambar 5.4 Pohon Filogenetik Rusa Bawean ( <i>Axis kuhlii</i> ) dengan Menggunakan Metode <i>Neighbor-Joining</i> dengan replikasi <i>bootstrap</i> 1000x .....	49

## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
μL	Mikroliter
ADW	Animal Diversity Web
BKSDA	Balai Konsevasi Sumber Daya Alam
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	<i>Base Pair</i>
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
CITES	<i>Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora</i>
Cm	Sentimeter
ddH <sub>2</sub> O	<i>Doubele distilled water</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Triphospat deoxynucleoside</i>
ddNTPs	<i>Dideoksinukleotida triphospat</i>
D-LOOP	<i>displacement loop</i>
EtBr	<i>Etidium bromida</i>
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
kb	<i>Kilobase</i>
Kg	Kilogram
Mg	Magnesium

mL	Mililiter
mm	Milimeter
mtDNA	DNA Mitokondria
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OXPHOS	<i>oxidative phosphorylation complexes</i>
PAG	<i>polyacrylamide gel</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potential of Hydrogen
Pmol	<i>Picomol</i>
rRNAs	Ribosomal ribonucleic acid
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	<i>Tris/Acetate/EDTA</i>
TSI II Prigen	Taman Safari Indonesia II Prigen
tRNAs	Transfer ribonucleic acid
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
TPE	<i>Tris/Phosphate/EDTA</i>
UV	Ultraviolet



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman hayati merupakan tingkat keragaman sumber daya alam yang ada di bumi. Keadaan keanekaragaman hayati saat ini mengalami beberapa ancaman. Ancaman-ancaman tersebut adalah terjadinya kerusakan dan kehilangan dari habitat, terjadinya eksploitasi berlebihan pada sumber daya alam, polusi, spesies invasif, perubahan iklim, terjadinya peningkatan populasi manusia, dan kegagalan dari sistem hukum (Mutia, 2009). Indonesia memiliki berbagai macam flora dan fauna. Salah satu hewan endemik yang ada di Indonesia dan memiliki habitat asli di Pulau Bawean saja adalah rusa Bawean.

Rusa Bawean adalah salah satu rusa asli dari Indonesia. Menurut *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), status dari rusa Bawean adalah *critically endangered* dengan jumlah 250-300 individu di alam liar (Semiadi, 2015). Status rusa Bawean berdasarkan *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES) adalah apendik I (CITES, 2017). Beberapa penyebab terjadinya penurunan jumlah dari rusa Bawean adalah perburuan yang terjadi secara berlebihan, hilangnya habitat dari rusa Bawean dikarenakan pembukaan lahan sehingga menyebabkan populasi rusa Bawean yang terpecah-pecah dan menyebabkan pertumbuhan yang terhambat (Subeno, 2009). Hilangnya pakan alami yaitu semak-semakan yang mulai habis dan kalah dari tanaman invasif yaitu *Chromolaena* (Trimanto, 2016). Tindakan konservasi adalah hal yang perlu dilakukan untuk menyelamatkan dari rusa Bawean dari ambang kepunahan.

Konservasi adalah upaya yang dilakukan oleh manusia untuk melestarikan ataupun upaya dalam melindungi alam. Konservasi untuk hewan dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu konservasi insitu dan eksitu. Konservasi eksitu adalah upaya melestarikan hewan yang dilakukan

diluar habitat aslinya. Konservasi eksitu juga mencakup dari tindakan *breeding* dan penyimpanan dari cikal bakal makhluk hidup seperti sperma, telur, embrio, dan juga gen (Salsi, 2011). Gen pada masing-masing spesies hewan di konservasi eksitu dapat disimpan dan digunakan untuk penelitian, hal ini dilakukan untuk membantu menjaga keberadaan suatu spesies hewan kedepannya. Penelitian yang dapat dilakukan salah satunya adalah melakukan analisa kekerabatan.

Analisa kekerabatan dilakukan untuk melihat kekerabatan dari masing-masing individu pada spesies hewan tertentu (Intraspecies) dan juga antara spesies yang berbeda (Interspecies). Intraspecies adalah membandingkan masing-masing individu pada spesies hewan tertentu dengan contoh melihat kekerabatan antar individu rusa Bawean satu dengan yang lainnya. Interspecies adalah membandingkan antara spesies yang berbeda dengan contoh melihat kekerabatan antara rusa Bawean dengan rusa Babi. Rusa Bawean dan rusa Babi memiliki kemiripan dari struktur anatomi cranium, dental, dan juga morfologinya dari luar, sehingga diperlukan analisa secara genetika. Penelitian sebelumnya mengenai analisa kekerabatan rusa Bawean sudah pernah dilakukan. Menurut Fautley (2013), yang meneliti dari kekerabatan pada *family* Cervidae, mendapatkan hasil kekerabatan antara rusa Bawean dan rusa Babi yaitu merupakan *sister species* dimana arti dari *sister species* adalah kedua spesies ini memiliki nenek moyang yang sama dan rusa Babi merupakan spesies *relative* terdekat dari rusa Bawean.

Analisa kekerabatan dapat dilakukan dengan melakukan analisa genetika melalui DNA mitokondria. DNA mitokondria adalah DNA *double helix* dengan bentuk sirkuler yang diturunkan secara penuh oleh induk betina sehingga bebas dari efek heterozigositas (Galtier, 2009). DNA mitokondria banyak digunakan untuk melihat variasi genetik dari suatu populasi hewan. Salah satu gen DNA mitokondria yang dapat digunakan untuk melihat variasi genetik

ataupun untuk analisa kekerabatan adalah gen *Cyt-b* (*cytochrome b*). Gen *Cyt-b* adalah gen *cytochrome* pada sistem transpor elektron yang terletak pada rantai respirasi dari mitokondria yang di kode oleh DNA mitokondria. Gen *Cyt-b* baik digunakan untuk determinasi kekerabatan filogenetik pada spesies dikarenakan dari variabilitas sekuennya dan sekuennya terjaga dengan baik dimasing-masing spesies (Othman, 2017).

Taman Safari Indonesia II Prigen merupakan lembaga eksitu yang ada di Jawa Timur. TSI II Prigen memiliki beberapa jenis rusa, salah satunya adalah Rusa Bawean. Analisa kekerabatan Rusa Bawean pada TSI II Prigen akan membantu untuk melihat kekerabatan pada Rusa Bawean yang dijadikan sampel, dan diharapkan kedepannya bisa dilakukan untuk program *breeding*.

Berdasarkan hal tersebut, maka tindakan konservasi yaitu yang salah satunya adalah memiliki data gen dan melakukan analisa secara genetik dapat dilakukan pada Rusa Bawean. Gen *Cyt-b* yang merupakan gen DNA mitokondria yang diturunkan oleh induk sehingga tidak terganggu oleh heterozigositas dapat digunakan untuk analisa kekerabatan. Berdasarkan hal-hal yang telah dipaparkan diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kekerabatan individu rusa Bawean yang ada di Taman Safari Indonesia II Prigen dengan melakukan analisa kekerabatan secara intraspecies dan interspecies berdasarkan sekuen gen *Cyt-b* dengan metode *polymerase chain reaction*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang hubungan kekerabatan antar rusa bawean (intraspecies) di TSI II Prigen dan kekerabatan rusa Bawean di TSI II Prigen dengan rusa Babi dari data *gene bank* NCBI.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kekerabatan individual (intraspecies) berdasarkan sekuen gen *Cyt-b* dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) pada rusa Bawean di TSI II Prigen?

2. Bagaimana jarak genetik antar spesies (interspecies) antara rusa Bawean (*Axis kuhlii*) dengan rusa Babi (*Axis porcinus*)?

### 1.3 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah darah 4 ekor rusa Bawean (*Axis kuhlii*) dewasa (usia 3 tahun), 2 ekor berjenis kelamin jantan dan 2 ekor berjenis kelamin betina yang berada di TSI II Prigen Jawa Timur.
2. Gen *Cyt-b* diisolasi dari darah rusa bawean menggunakan *QIAamp*<sup>®</sup> *DNA Mini Kit* (50). Pengambilan sampel darah dilakukan melalui *vena jugularis*.
3. Primer gen *Cyt-b* didesain menggunakan gen *Cyt-b* dari rusa Bawean menggunakan program *Primer 3plus*.
4. Amplifikasi DNA gen *Cyt-b* rusa Bawean dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan sepasang primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GACAAAGCAACCTTAACCCG-3' dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-CGTTGTTTGGATGTGTGGAG-3'.
5. Metode PCR dilakukan dengan mesin *Biorad* dengan program: predenaturasi 94°C selama empat menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 50,9°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama satu menit, dan *post extension* 72°C selama tujuh menit.
6. Sekuensing DNA dilakukan dengan metode *Sanger* (*dye terminator labelling*) dengan menggunakan sepasang primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GACAAAGCAACCTTAACCCG-3' dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-CGTTGTTTGGATGTGTGGAG-3'.
7. Analisa data dilakukan dengan mendeskripsikan perbedaan sekuen DNA dan tingkat kekerabatan antar rusa bawean di TSI II Prigen dan jarak genetik rusa Bawean dengan

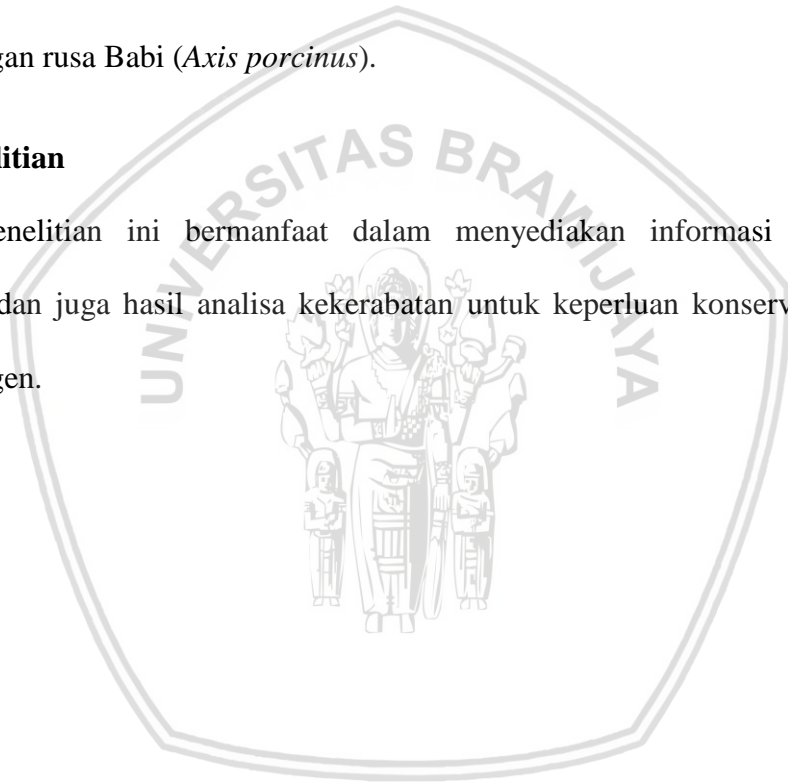
rusa Babi menggunakan program *Bioedit* dan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI serta program MEGA.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui kekerabatan individual (intraspecies) berdasarkan sekuen gen *Cyt-b* dan jarak genetik pada rusa Bawean (*Axis kuhlii*) di TSI II Prigen.
2. Untuk mengetahui jarak genetik antar spesies (interspecies) antara rusa Bawean (*Axis kuhlii*) dengan rusa Babi (*Axis porcinus*).

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi genetik berupa perpustakaan gen dan juga hasil analisa kekerabatan untuk keperluan konservasi genetik rusa Bawean TSI II Prigen.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Rusa Bawean ( *Axis kuhlii* )

Rusa Bawean ( *Axis kuhlii* ) merupakan salah satu dari empat spesies rusa yang ada di Indonesia. Keempat spesies rusa yang ada di Indonesia adalah rusa menjangan, rusa timor, kijang, dan terakhir adalah rusa bawean. Sejarah rusa Bawean bermula dari zaman *Pleistocene*, dimana pada zaman itu terdapat daerah yang disebut kepulauan *Sundaland*. Kepulauan *Sundaland* meliputi dari Kalimantan, Jawa, Bali, Palawan, Kepulauan Mentawai, Malay Peninsula hingga ke Kra Isthmus. Pada zaman *Pleistocene*, beberapa spesies rusa hidup di kepulauan *Sundaland* seperti rusa Babi, Chital, rusa Calamian, rusa Sika, rusa Bawean, dan rusa-rusa lainnya, sehingga pada zaman tersebut kemungkinan besar rusa-rusa tersebut berada pada daerah dan habitat yang sama (Gruwier, 2015).

Menurut Gruwier (2015), bahwa rusa Bawean dulunya merupakan bagian rusa Babi yang hidup di Kepulauan *Sundaland*, dan mengalami perubahan habitat dimana terjadi perpecahan pulau-pulau dan menyebabkan terpisahnya populasi rusa Babi, yang selanjutnya mengalami adaptasi habitat selama bertahun-tahun dan memunculkan spesies baru yaitu rusa Bawean. Pada awal zaman Holocene, rusa Bawean tersebar di Pulau Bawean dan beberapa daerah di Pulau Jawa, namun selama berjalannya waktu, sekarang rusa Bawean memiliki habitat asli hanya di Pulau Bawean.

Taksonomi dari rusa bawean adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata



Class : Mammalia  
Ordo : Artiodactyla  
Family : Cervidae  
Genus : Axis  
Spesies : *Axis kuhlii*



**Gambar 2.1** Rusa Bawean (Semiadi, 2015).

Morfologi dari rusa Bawean dewasa adalah memiliki tinggi badan kurang lebih 165 cm, dengan tinggi kaki depan sekitar 31,5 cm, dan panjang tubuh 140 cm. Berat badan rusa Bawean dewasa adalah 20-30 kg. Warna rambut adalah coklat dengan sedikit campuran warna kuning, lapisan rambut halus dan lembut. Panjang ekor kurang lebih 20 cm dengan warna rambut coklat dibagian atas, dan warna rambut putih dibagian bawah. Pada rusa bawean jantan dewasa memiliki sepasang tanduk yang bercabang 3 pada bagian ranggahnya. Pada rusa bawean anakan memiliki berat lahir 1,5-2 kg, dan pada bagian punggung dari anakan rusa bawean memiliki totol yang berwarna putih dan selanjutnya akan hilang beberapa hari setelah lahir (Iqbal, 2004).

Rusa bawean merupakan rusa endemik Pulau Bawean yaitu pada bagian utara dari Kecamatan Sangkapura. Pulau Bawean memiliki sebagian besar kawasan hutan hujan dengan iklim kering. Hutan hujan tersebut dibagi menjadi 3, pertama adalah ekosistem hutan primer yang berada pada lokasi yang tinggi. kedua adalah ekosistem hutan sekunder dengan jenis tumbuhan campuran jenis tumbuhan rimba alam muda dan tumbuhan belukar. Ketiga adalah

ekosistem hutan jati (Subeno, 2009). Menurut Semiadi (2015), habitat dari rusa bawean berada pada kawasan ekosistem hutan primer dan ekosistem hutan sekunder. Pakan alami dari rusa bawean adalah tanaman herba, rumput-rumputan, dan juga tumbuhan kayu. Contohnya pada tanaman herba adalah *Artocarpus sp* dengan bagian yang dimakan adalah daunnya, contoh tanaman rumput-rumputan adalah rumput padang dengan bagian yang dimakan adalah daunnya, contoh tanaman tumbuhan kayu adalah *Ficus variegata* dengan bagian yang dimakan adalah tunasnya (Subeno, 2009). Populasi rusa Bawean menurut Semiadi (2015) adalah sekitar 250-300 individu di Pulau Bawean. Penelitian tentang populasi rusa Bawean di Pulau Bawean yang terbaru menyatakan bahwa populasinya adalah sekitar 242-416 individu (Rahman, 2016).

Tingkah laku dari rusa bawean adalah hewan nokturnal dimana artinya hewan ini lebih aktif mencari makan dan beraktivitas di malam hari. Rusa bawean merupakan hewan *terrestrial* dimana artinya hewan ini menghabiskan waktunya berada di atas tanah atau beraktivitas di tanah. Musim kawin dari rusa bawean biasa terjadi pada musim kemarau, dengan masa kebuntingan 7-8 bulan. Anak yang dilahirkan dalam sekali kebuntingan adalah 1-2 ekor anakan.

Menurut Semiadi (2015), status IUCN dari rusa bawean adalah *critically endangered* yang memiliki arti bahwa rusa ini berada diambang kepunahan. Status rusa bawean berdasarkan CITES adalah *appendix I*, yang memiliki arti bahwa spesies ini mengalami bahaya kepunahan dikarenakan dari penjualan secara internasional, sehingga spesies ini sudah tidak boleh sama sekali diperjual belikan diseluruh negara. Ancaman-ancaman yang mendukung terjadinya kepunahan pada rusa Bawean adalah hilangnya habitat asli dari rusa Bawean.

Pembentukan kawasan konservasi yang mengalami gangguan dari masyarakat sekitar, dimana daerah yang dijadikan daerah konservasi juga dijadikan lahan pertanian oleh masyarakat sekitar. Populasi manusia di Pulau Bawean adalah kurang lebih 70.000 orang, dan pertumbuhan

penduduk yang semakin tinggi, maka banyak hutan yang dialih fungsikan menjadi sawah dan perkebunan. Lahan konservasi menjadi terpecah-pecah dikarenakan terjadinya konflik antara pemerintah dengan masyarakat tentang lahan di Pulau Bawean, sehingga menyebabkan habitat dari rusa Bawean yang menjadi terpecah-pecah (Subeno, 2009). Perburuan yang tidak terkontrol juga menyebabkan terjadinya penurunan jumlah populasi dari rusa bawean. Tanaman invasif seperti *Chromolaena* yang mengalahkan pakan alami seperti rumput-rumputan dapat menyebabkan kekurangan pakan, sehingga dapat menyebabkan menurunnya populasi dari rusa bawean (Trimanto, 2016).

## 2.2 Perbandingan Morfologi Rusa Bawean dengan Rusa Babi

Rusa Bawean dan rusa Babi memiliki kemiripan dari morfologinya. Morfologi rusa Bawean seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya adalah memiliki tinggi badan kurang lebih 165 cm, dengan tinggi kaki depan sekitar 31,5 cm, dan panjang tubuh 140 cm. Berat badan rusa Bawean dewasa adalah 20-30 kg. Warna rambut adalah coklat dengan sedikit campuran warna kuning, lapisan rambut halus dan lembut. Panjang ekor kurang lebih 20 cm dengan warna rambut coklat dibagian atas, dan warna rambut putih dibagian bawah. Pada rusa Bawean jantan dewasa memiliki sepasang tanduk yang bercabang 3 pada bagian ranggahnya. Pada rusa Bawean anakan memiliki berat lahir 1,5-2 kg, dan pada bagian punggung dari anakan rusa bawean memiliki totol yang berwarna putih dan selanjutnya akan hilang beberapa hari setelah lahir (Iqbal, 2004).

Morfologi rusa Babi adalah memiliki panjang tubuh 125-135 cm, dengan kaki belakang yang lebih panjang dibandingkan dengan kaki depan. Berat badan rusa Babi adalah 36-50 kg. Warna rambut pada rusa Babi dewasa adalah coklat atau *dark olive brown*. Punggung rusa Babi memiliki garis yang lebih gelap. Warna rambut rusa Babi dewasa dapat berubah pada musim

panas, dimana pada bagian tubuh seperti *flank* akan muncul bitnik-bintik berwarna putih ataupun krem. Anakan rusa Babi memiliki warna coklat muda dengan bitnik-bintik krem ataupun putih pada bagian *flank*, setelah 6 bulan warna rambut akan berubah menjadi lebih gelap dan bintiknya akan menghilang. Telinga rusa Babi berbentuk bulat dengan ukuran besar dan memiliki warna rambut putih. Pada rusa Babi jantan dewasa memiliki sepasang tanduk yang bercabang 3 pada bagian ranggahnya. Tanduk rusa Babi lebih kecil bila dibandingkan dengan sub-spesies lain pada genus *Axis* (ADW, 2014).



**Gambar 2.2** Rusa Babi (kiri) dan Rusa Bawean (kanan) (Geist, 1998).



**Gambar 2.3** Rusa Babi (Kiri) dan Rusa Bawean (Kanan) (Google Image, 2018).

Penelitian tentang morfometri dari kedua rusa ini sudah pernah dilakukan. Menurut Meijaard (2004), yang melakukan penelitian tentang *craniometri* yang dihitung kedalam perhitungan statistik didapat hasil bahwa berdasarkan craniometri, kedua rusa sangat mirip dimana terbukti

bahwa *Axis porcinus*, *Axis kuhlii* dan *Axis calamianensis* berada pada 1 grup yang sama dan berbeda dari *Axis axis*. Pohon filogenetik yang dibentuk menggunakan Neighbour-joining dengan data craniometri tersebut membuktikan bahwa *Axis kuhlii* dan *Axis porcinus* sangat mirip dan sulit untuk dibedakan. Penelitian lain tentang morfometri kedua rusa ini dilakukan oleh Gruwier (2015), yang melakukan morfometri menggunakan gigi molar ke 3. Alasan menggunakan gigi molar ke 3 dikarenakan gigi molar ke 3 mengalami abrasi interproximal yang lebih rendah dibandingkan gigi molar yang lain, sehingga diharapkan hasil yang didapat lebih baik dan lebih akurat. Penelitian ini mendapat hasil bahwa perbandingan antara *Axis kuhlii* dan *Axis porcinus* berdasarkan gigi molar 3 yang dihitung dengan perhitungan statistik memiliki angka yang sama persis yaitu 0,354. Penelitian morfometri yang sudah dilakukan masih memiliki kesulitan untuk membedakan kedua spesies tersebut, sehingga penelitian secara molekuler atau genetika dapat dilakukan untuk studi lebih lanjut tentang kedua spesies rusa ini.

### 2.3 DNA mitokondria (mtDNA)

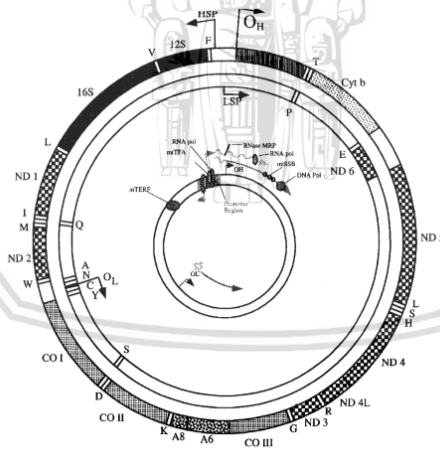
DNA mitokondria adalah DNA yang terletak pada bagian matriks dari mitokondria. DNA mitokondria memiliki rantai ganda, berbentuk sirkular, dengan panjang *base pair* kurang lebih 17.000. Hewan-hewan bertulang belakang memiliki kurang lebih 1000-5000 molekul pada sirkular mitokondria genome. MtDNA terdiri atas untai *Heavy* (H), dan untai *Light* (L). Terbaginya untai mtDNA dinamakan berdasarkan perbedaan densitas dalam gradient denaturasi *Cesium Chloride* (CsCl). Untai H memiliki berat molekul lebih besar dibandingkan untai L. Untai H lebih berat dikarenakan lebih banyak memiliki basa-basa purin yang memiliki 2 buah cincin pada strukturnya (Ngili, 2012).

MtDNA memiliki 2 *region*, yaitu *coding region* dan *non-coding region*. *Coding region* terdiri dari 13 *encoding* polipeptida, 22 transfer RNAs (tRNAs) dan 2 ribosomal RNAs (rRNAs)



yaitu 12s dan 16s rRNAs. *Encoding* polipeptida ada 13, dimana semua *encoding* polipeptida tersebut adalah golongan dari *oxidative phosphorylation complexes* (OXPHOS). OXPHOS terdiri dari 7 sub unit kompleks I, 1 sub unit kompleks III, 3 sub unit kompleks IV, dan 2 sub unit kompleks V. *Non-coding region* pada mtDNA adalah *displacement loop* (D-LOOP). D-LOOP *region* merupakan daerah untuk replikasi dan promotor transkripsi dari mtDNA (Moraes, 2002).

MtDNA merupakan DNA yang relative mudah untuk dilakukan amplifikasi karena memiliki banyak kopian di sel. Konten dari mtDNA tersimpan baik disetiap hewan, dengan sedikit duplikasi, tidak memiliki intron, dan memiliki *intergenic regions* yang pendek. MtDNA diturunkan secara maternal sehingga disebut klonal. MtDNA memiliki properti biologi yang spesifik, sehingga dapat digunakan sebagai marker untuk keanekaragaman hayati berbasis molekular (Galtier, 2009).

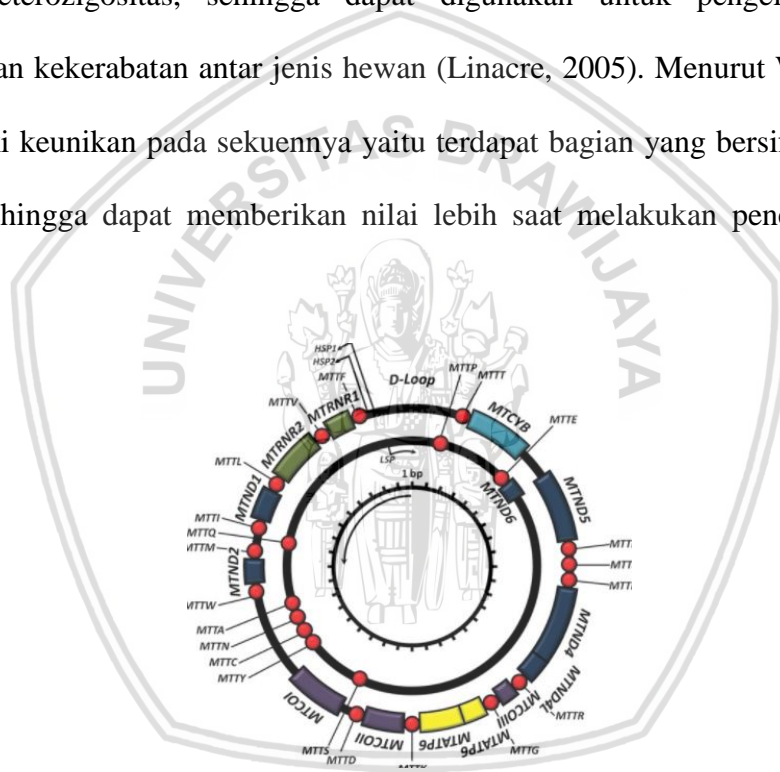


**Gambar 2.4** DNA mitokondria (Moraes, 2002).

## 2.4 Gen *Cyt-b* (Cytochrome *b*)



Gen *Cyt-b* adalah salah satu dari DNA mitokondria, dimana gen ini berada pada kompleks III dari rantai respirasi seluler pada organisme. *Cyt-b* berisi 8 transmembran heliks yang kemudian dihubungkan oleh intramembrane ataupun domain ekstramembran. Ukuran *base pair* gen *Cyt-b* kurang lebih 1140 bp. Gen *Cyt-b* sering digunakan untuk identifikasi taksonomi dan filogenik pada berbagai spesies hewan (Hsieh, 2001). Hal ini disebabkan karena gen ini termasuk kedalam gen mtDNA yang secara penuh diturunkan oleh induk betina, sehingga tidak ada pengaruh oleh heterozigositas, sehingga dapat digunakan untuk pengelompokan dalam penentuan hubungan kekerabatan antar jenis hewan (Linacre, 2005). Menurut Widowati (2013), gen *Cyt-b* memiliki keunikan pada sekuennya yaitu terdapat bagian yang bersifat kekal didalam tingkat spesies, sehingga dapat memberikan nilai lebih saat melakukan penentuan hubungan kekerabatan.



**Gambar 2.5** Letak gen *Cyt-b* dalam DNA mitokondria (Chinnery, 2013).

## 2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

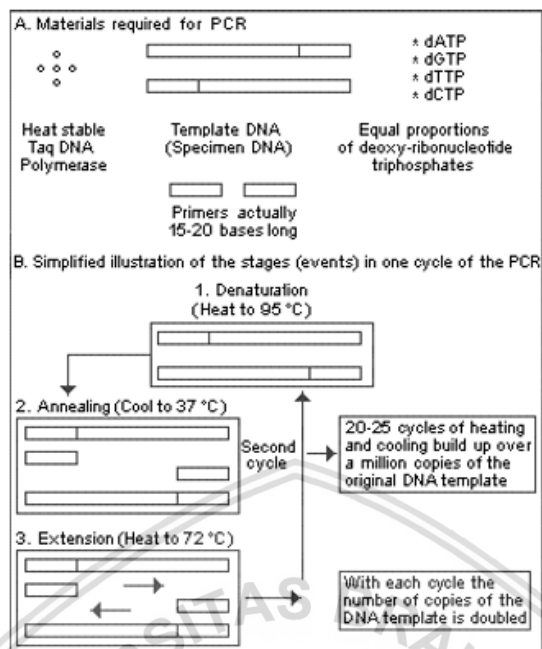
*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu teknik biologi molekular yang memiliki tujuan untuk melakukan amplifikasi pada sekuen DNA tertentu. Teknik ini

dikembangkan oleh seorang ilmuwan dari Amerika yaitu Katy Mullis. Bagian atau komponen-komponen yang perlu disiapkan dalam proses PCR adalah templat DNA, sepasang primer (*forward* dan *reverse*), dNTPs, buffer PCR, magnesium klorida, dan enzim polimerase DNA.

Templat DNA digunakan sebagai cetakan rantai DNA yang diinginkan. Cara untuk mendapatkan templat DNA dari sampel penelitian adalah dengan melisiskan sampel ataupun dengan melakukan isolasi DNA. Melisiskan sampel dapat menggunakan buffer PCR (50mM KCl, 10-20mM Tris-Cl dan 2,5mM MgCl<sub>2</sub>); 0,5 % Tween-20 dan 100 ug/mL Proteinase-K (ditambahkan dalam keadaan segar). Isolasi DNA juga dapat dilakukan, tetapi prosesnya lebih rumit dari melisiskan. Kelebihan dari isolasi DNA adalah mendapatkan kualitas DNA yang lebih baik dan murni. Primer merupakan komponen yang harus dimiliki dalam melakukan proses PCR. Perancangan primer dapat diambil dari *genbank* (Handoyo, 2000). Komposisi dari primer yang baik adalah memiliki panjang *base pair* 15-30 bp, jumlah basa G-C adalah sekitar 40-60%, bagian ujung 3' primer sebaiknya basa G atau C, *melting temperature* optimal adalah sekitar 52-58°C walaupun sebenarnya bisa dengan *range* 45-65°C, pengulangan dari basa nitrogen dalam 1 primer maksimal 4 kali (Lorenz, 2012). dNTPs merupakan *building block* yang digunakan untuk proses *extention*. Buffer PCR berguna untuk menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion Mg<sup>2+</sup>, ion tersebut berasal dari *basal* MgCl<sub>2</sub>. MgCl<sub>2</sub> bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Enzim DNA polimerase berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim DNA polimerasi berasal dari isolasi bakteri. Contoh bakteri yang digunakan menjadi DNA polimerase adalah *Pyrococcus furiosus* dan *Thermus aquaticus* (Handoyo, 2000).

Secara umum, proses PCR dibagi menjadi 3 tahap yaitu denaturasi, *annealing*, dan *extension* (Joshi, 2010). Proses pertama adalah Denaturasi. Denaturasi pada DNA yang memiliki untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Cara melakukan denaturasi adalah dengan meningkatkan suhu 95-98°C dalam waktu kurang lebih 60 detik. DNA dengan untai tunggal digunakan sebagai templat untuk tempat penempelan dari primer. Proses kedua adalah *annealing*, dimana memiliki arti penempelan. Proses penempelan terjadi pada suhu 50-60°C. Primer dapat melakukan hibridisasi pada templat komplemen. Rantai DNA yang baru terbentuk dari penempelan primer dan template, digunakan untuk membuat kopian rantai yang identik. Proses ketiga adalah *extension*. Proses *extension* pada primer oleh *taq polymerase* terjadi pada suhu 72°C dalam waktu 2-5 menit. Kehebatan dalam teknik PCR adalah siklus dari PCR terjadi dengan cepat dan menghasilkan 2 kali jumlah kopian DNA dalam sekali siklus. Banyaknya siklus dalam mesin PCR adalah sekitar 25-30 kali. Hasil akhir dalam melakukan PCR dapat dirumuskan dengan  $2^n$ , dimana n adalah jumlah siklus PCR (Joshi, 2010).

Menurut Handoyo (2000), tahap dari teknik PCR adalah pertama proses pra denaturasi, kedua adalah proses denaturasi DNA templat, proses ketiga adalah *annealing*, keempat adalah proses *extension*, dan kelima adalah pemantapan. Proses kedua dan keempat adalah tahapan berulang atau siklus, dimana di setiap siklus akan terjadi duplikasi dari jumlah DNA. Rumus yang digunakan untuk menghitung jumlah kopian dari rantai DNA yang diinginkan adalah  $Y = (2^n - 2n)X$ , dimana Y adalah jumlah amplifikasi, n adalah jumlah siklus, dan X adalah jumlah molekul DNA templat awal.



**Gambar 2.6** Tahapan pada mesin PCR (Giasuddin, 1995).

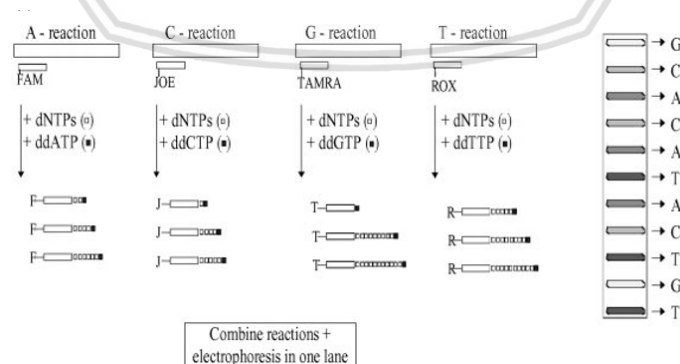
## 2.6 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA merupakan sebuah proses dari menentukan susunan nukleotida yaitu dari adenine, guanine, sitosin, dan timin suatu molekul DNA. Proses ini pertama kali dilakukan oleh peneliti pada tahun 1970, dengan menggunakan metode 2 dimensional kromatografi. Seiring berjalannya waktu, sekuensing DNA berkembang dari 2 dimensional kromatografi hingga menjadi teknik sekuensing dengan berbasis mesin otomatis, sehingga kepentingan sekuensing DNA dilakukan untuk teknik diagnostik suatu penyakit, dan juga untuk bidang forensik. Teknik sekuensing yang sering digunakan adalah metode Sanger (Munshi, 2012).

Metode Sanger merupakan proses sekuensing yang bergantung pada terminasi dari rantai basa spesifik dengan perbedaan reaksi pada adenin, guanin, sitosin, dan timin berdasarkan 4 nukleotid berbeda dari substansi dasar DNA (**Gambar 2.7**). Reaksi yang terjadi adalah dari 4 dNTPs yang digunakan, akan ditambahkan ddNTP spesifik dengan contoh ddATP akan bereaksi

dengan “A”. Perpanjangan rantai baru yang disintesis dari DNA akan berawal setiap saat setelah ddNTP digabungkan. Karena ddNTP hadir dalam jumlah kecil, penghentiannya jarang terjadi dan secara stokastik, sehingga menghasilkan perpanjangan produk koktail dimana setiap posisi basa “N” akan menghasilkan produk yang sesuai yang diakhiri dengan penggabungan ddNTP di akhir 3’ (Munshi, 2012).

Proses selanjutnya adalah menggunakan fosfor radioaktif atau isotop sulfur, yang nantinya akan dicampur dengan rantai DNA yang baru disintesis melalui label prekursor sehingga setiap produk dapat terdeteksi oleh radiografi. Selanjutnya dilakukan pemisahan dari masing-masing molekul. Penggunaan dari *polyacrylamide gel* (PAG) dilakukan untuk pengukuran yang tepat dengan menggunakan elektroforesis (Men, 2008). Pewarnaan primer menggunakan *fluorescent* dapat dilakukan. Primer berlabel *fluorescent* bercampur dengan ddNTP spesifik, kemudian dimasukkan kedalam *slab gel* dalam 1 garis. Pita akan terdeteksi saat eksitasi dari *fluorescent moiety* yang berikatan dengan DNA menggunakan *laser beam* pada bagian akhir dari *gel*. Cahaya *fluorescent* akan dipisahkan menjadi 4 filter, kemudian dilakukan pembacaan sekuensing DNA. Primer berlabel *fluorescent* dapat menggunakan sekuensing DNA secara otomatis (Franca, 2002).



**Gambar 2.7** Skema sekuensing DNA metode Sanger (Franca, 2002).

## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

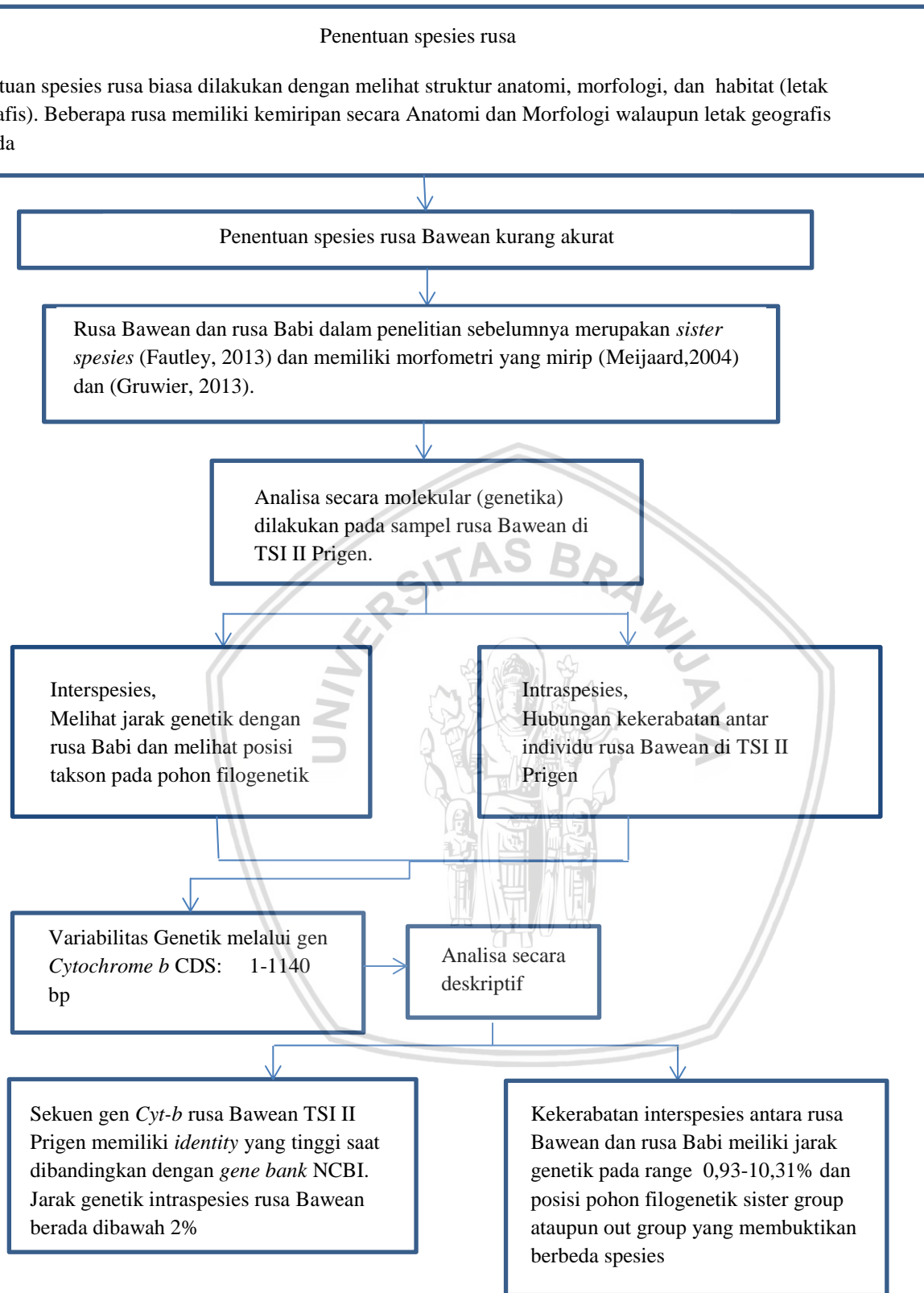
### 3.1 Kerangka Konseptual

Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) merupakan hewan yang memiliki status *critically endangered* menurut IUCN. Tindakan konservasi harus dilakukan untuk menyelamatkan hewan tersebut yaitu salah satunya dengan memiliki data gen yang dapat digunakan untuk kedepannya. Analisa kekerabatan dapat dilakukan untuk melihat kekerabatan pada suatu individu spesies (intraspecies) dan membandingkan dengan spesies yang lain (interspecies). Perbandingan interspecies dilakukan dengan membandingkan sampel rusa Bawean dengan gen rusa Babi dari NCBI, hal ini dilakukan karena rusa Bawean dan rusa Babi memiliki kemiripan secara anatomi cranium, dental, dan morfologi dari luar (Meijaard, 2004) dan (Gruwier, 2013). Penelitian sebelumnya secara molekuler pernah dilakukan dimana rusa Bawean dan rusa Babi merupakan *sister spesies* (Fautley, 2013). Hal tersebut menjadikan kedua rusa ini sulit untuk di bedakan, sehingga untuk melihat analisis secara molekuler pada rusa Bawean TSI II Prigen selain dibandingkan dengan masing-masing individu juga perlu dilihat perbandingannya dengan rusa Babi yang merupakan spesies terdekat dari rusa Bawean. Sampel darah diambil dari masing-masing individu dari rusa Bawean, yang selajutnya akan di isolasi untuk mendapatkan DNA. Gen yang digunakan adalah gen *Cyt-b*. Gen *Cyt-b* dapat digunakan untuk menentukan kekerabatan dari suatu individu didalam suatu populasi sehingga dapat menggambarkan bagaimana gen dapat berhubungan satu sama lain dan memiliki variabilitas sekuen yang tinggi antar spesies. Masing-masing sampel rusa Bawean akan dibandingkan antar individu dan dibandingkan dengan rusa Babi dengan *gene bank* (NCBI) yaitu HQ893538.1 untuk rusa Bawean dan MF435989.1 untuk rusa Babi.



Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik PCR adalah teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* yang membutuhkan sepasang primer *forward* dan primer *reverse* dengan target gen 419 bp dari total 1140 bp. Teknik selanjutnya adalah melakukan sekuensing untuk mendapatkan urutan basa nukleotida dengan memisahkan masing-masing basa nukleotida. Hasil sekuen DNA dilakukan penyejajaran menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment*, selanjutnya dilakukan analisa kekerabatan antar rusa Bawean secara deskriptif dari hasil pengolahan perangkat lunak MEGA versi 7.0. Hasil sekuen yang didapatkan selanjutnya akan dibandingkan dengan gen spesies terdekat yaitu rusa Babi dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* (NJ) (Fautley, 2013).

Hasil yang diharapkan pada penelitian ini adalah kekerabatan secara intraspesies antar individu sampel rusa Bawean TSI II Prigen memiliki *identity* sekuen gen *Cyt-b* yang tinggi jika dibandingkan dengan data gene bank NCBI rusa Bawean (HQ893538.1) dan jarak genetik antar individu rusa Bawean berada dibawah 2%. Kekerabatan secara interspesies antara rusa Bawean dengan rusa Babi adalah melihat dari jarak genetik yang berada pada *range* 0,93-10,31% dan posisi dari pohon filogenetik yaitu dalam posisi *sister spesies* ataupun *out group* sehingga terlihat bahwa kedua rusa tersebut berbeda spesies. Bagan kerangka konseptual akan dijelaskan pada **Gambar 3.1.**

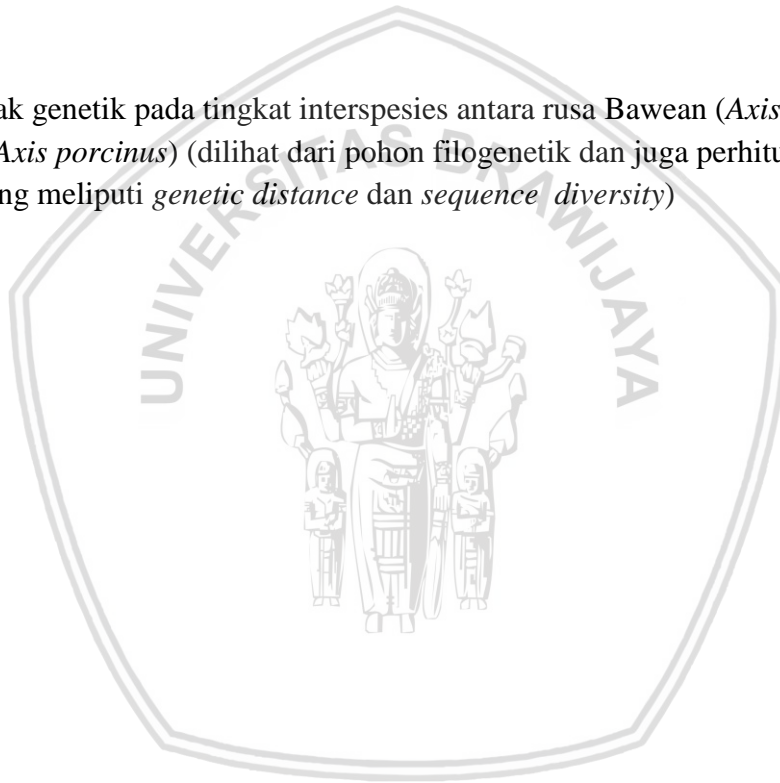


**Gambar 3.1** Bagan Kerangka Konseptual

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Rusa Bawean yang dijadikan sampel pada TSI II Prigen memiliki kekerabatan yang sesuai dengan kekerabatan pada tingkat intraspecies (dilihat dari pohon filogenetik dan juga perhitungan *pairwise distance* yang meliputi *genetic distance* dan *sequence diversity*).
2. Melihat jarak genetik pada tingkat interspecies antara rusa Bawean (*Axis kuhlii*) dengan rusa Babi (*Axis porcinus*) (dilihat dari pohon filogenetik dan juga perhitungan *pairwise distance* yang meliputi *genetic distance* dan *sequence diversity*)



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada beberapa laboratorium yaitu pertama, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang untuk persiapan bahan dan pemesanan primer. Kedua adalah Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Ibrahim untuk melakukan nanodrop. Ketiga, adalah Laboratorium ADD (*Animal diagnostic disease*) FKH UB untuk pelaksanaan PCR pada bulan Desember 2017- Maret 2018.

### 4.2 Pemilihan Sampel Rusa Bawean

Populasi rusa Bawean di TSI II Prigen adalah sekitar 31 ekor dimana jantan memiliki total 14 ekor dan betina memiliki total 17 ekor. Asal-usul dari rusa Bawean disana berasal dari Pulau Bawean dan juga ada yang didapatkan dari sitaan BKSDA. Bawean yang diambil darahnya ada 8 ekor, dimana terdapat 2 jantan dan 6 betina yang diambil dari kandang penangkaran. Pemilihan sampel penelitian dilakukan dengan metode *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah metode sampling yang bersifat subjektif, dimana peneliti menentukan kriteria sampel yang diinginkan dalam penelitiannya (Magnani, 1997).

Kriteria sampel yang digunakan adalah mengambil sampel jantan dewasa, mengambil sampel betina dewasa, dan kelahiran di TSI II Prigen. Pemilihan sampel dilakukan bersama dengan pihak TSI II Prigen, dimana mengambil yang dewasa untuk lebih melihat kekerabatannya dan selanjutnya diharapkan apakah bisa untuk dikawinkan atau tidak. Dari 8 ekor yang telah diambil darahnya, selanjutnya diambil 4 sampel darah individu rusa Bawean yang digunakan untuk penelitian kekerabatan.

Data informasi individu sampel rusa Bawean dijelaskan pada **Tabel 4.1**.

**Tabel 4.1 Data Informasi Individu Sampel Rusa Bawean**

No.	Nama	Umur (Tahun)	Jenis Kelamin	Asal Kelahiran	Simbol
1	Abi	3	Jantan	TSI II Prigen	A1
2	Ani	3	Betina	TSI II Prigen	A2
3	Aba	3	Jantan	TSI II Prigen	A3
4	Ana	3	Betina	TSI II Prigen	A4

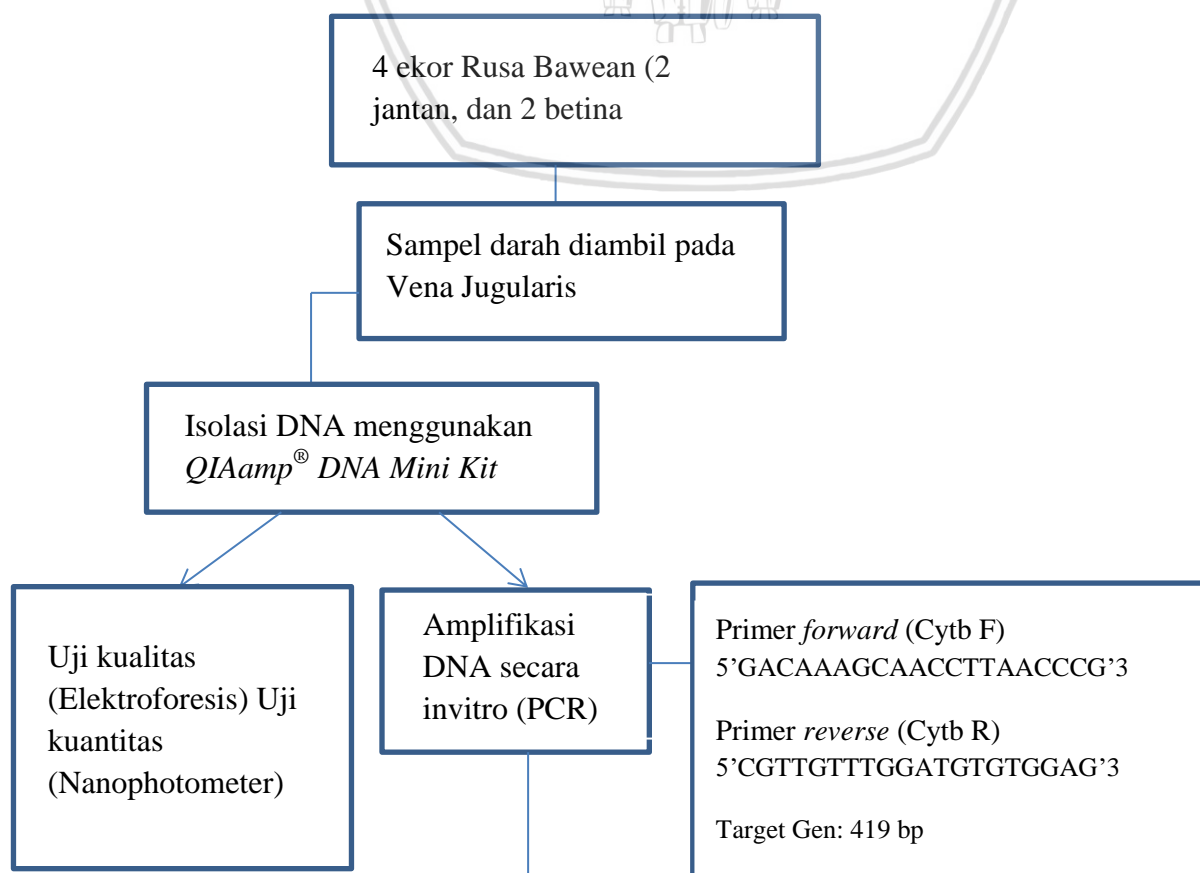
### 4.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sarung tangan, masker, *disposable syringe*, kamera, tisu, *ice box*, tabung EDTA, kertas label, *microsentrifuge tube* (1,5 mL), *micro PCR tube* (200 µl), *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, mikropipet, mesin *vortex*, mesin penangas, sentrifugator, inkubator, timbangan analitik digital, *freezer*, mesin PCR (*SensoQuest Thermocycler*), mesin *sequencing*, komputer, ND-1000 *Spectrophotometer*, *Bio Step UV-Transilluminator* DH-40, dan *Mupid-Exu Electrophoresis*.

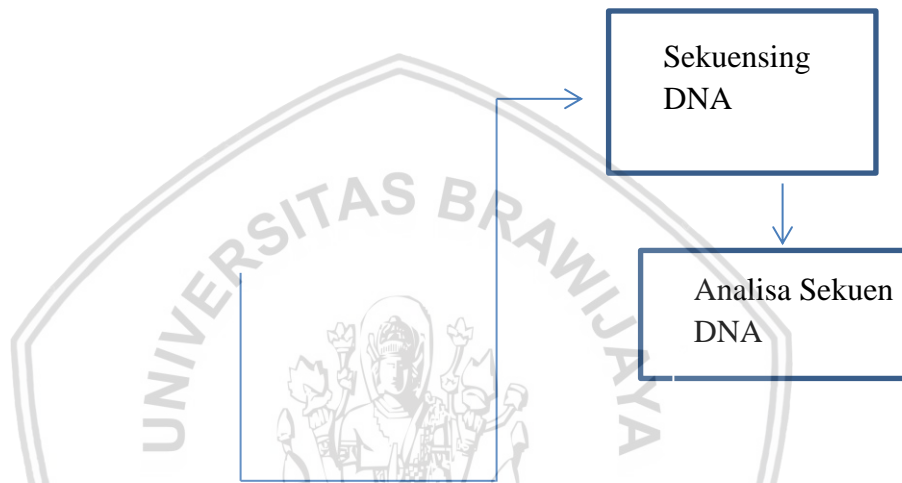
Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah 2 sampel darah rusa Bawean jantan dan 2 sampel darah rusa bawean betina dewasa kelahiran di Taman Safari Indonesia II Prigen, *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* (50), primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GACAAAGCAACCTTAACCCG-3' dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-CGTTGTTTGGATGTGTGGAG-3', PCR *mix* (Promega *Gotaq Green Master Mix*), ddH<sub>2</sub>O, DNA *ladder* 100 bp, DNA *ladder* 1 kb, Tris Borat EDTA (TBE 1 x), gel agarosa dengan konsentrasi 1% dan 2%, *loading dye*, ethanol absolut, alkohol 70%, akuades, aluminium foil, larutan perwarna etidium bromida (EtBr) dan natrium asetat 3M.

### 4.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah pertama melakukan pemilihan sampel individu rusa Bawean yang merupakan kelahiran di Taman Safari Indonesia II Prigen, Jawa Timur. Kedua adalah melakukan koleksi sampel berupa darah pada masing-masing individu pada rusa Bawean. Ketiga adalah melakukan isolasi DNA dari sampel darah yang didapat. Keempat melakukan uji kuantitas dan kualitas isolasi DNA total. Kelima adalah mendesain primer, meliputi primer forward dan primer reverse. Langkah selanjutnya adalah melakukan PCR. Produk hasil PCR, selanjutnya diuji secara kuantitas dan kualitasnya. Tahap selanjutnya adalah produk PCR di sekuensing, dan tahapan terakhir adalah menganalisa data. Kerangka operasional dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.







**Gambar 4.1** Kerangka Operasional

#### 4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian yang datanya akan dianalisa secara kualitatif dimana dilakukan dengan mendeskripsikan hasil analisa data. Data yang didapat selanjutnya akan di sekuensing dan didapatkan sekuen gen *Cyt-b*. Data sekuen yang didapatkan akan dibuat menjadi pohon filogenetik yang digunakan untuk menentukan kekerabatan rusa Bawean secara individu dan juga dengan rusa Babi. Jumlah sampel yang diuji ada 4 yang merupakan sampel darah dari rusa bawean. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA melalui sampel darah tersebut dengan menggunakan *QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* (50). Hasil isolasi DNA total akan diuji secara kuantitatif dengan menggunakan nanospektrofotometri dan secara kualitatif dengan melakukan elektroforesis dengan menggunakan agarosa gel konsentrasi 1%. Selanjutnya, sampel DNA

diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *forward* (CYTB\_F) 5'-GACAAAGCAACCTTAACCCG-3' dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-CGTTGTTTGGATGTGTGGAG-3'. Untuk kualitatif dilakukan dengan menggunakan elektroforesis dengan agarosa gel konsentrasi 2%. Hal ini dilakukan untuk mengetahui ukuran fragmen produk PCR apakah sesuai dengan yang dituju atau tidak. Hasil produk PCR selanjutnya dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing fragmen DNA kemudian dianalisis dengan menggunakan program *BioEdit*, BLAST NCBI dan MEGA versi 7.0 serta dianalisa secara deskriptif atau kualitatif.

## 4.6 Prosedur Kerja

### 4.6.1 Pengambilan Sampel Darah Rusa Bawean

Rusa Bawean yang akan dilakukan pengambilan darah sebelumnya dilakukan anestesi terlebih dahulu. Anestesi yang dapat digunakan adalah paduan antara *xylazine*-*tiletamin*-*zolazepam* (Rosef, 2004). Obat anestesi yang digunakan pada TSI II Prigen adalah menggunakan *xylazine*. Perhitungan volume obat dilakukan, dan selanjutnya obat dimasukkan kedalam *dart* plastik. *Dart* plastik dimasukkan kedalam *blowgun*, dan ditembakkan pada jarak sekitar 10-15 meter. Menunggu hingga rusa mengalami kehilangan kesadaran, selanjutnya sampel darah rusa bawean diambil pada lokasi vena jugularis (Rosef, 2004). Volume sampel darah yang diambil sebanyak kurang lebih 3cc dari masing-masing empat individu rusa bawean. Wadah yang dipakai untuk menampung sampel darah adalah *vacutainer* EDTA. Masing-masing *vacutainer*

EDTA diberi identitas masing-masing individu rusa bawean. Sampel yang didapat disimpan pada lemari es pada suhu 4°C. Penyimpanan dilakukan jika sampel yang didapat tidak langsung di periksa, namun dengan jarak waktu beberapa jam ataupun beberapa hari (Fitria, 2016).

#### 4.6.2 Isolasi DNA

Sampel darah rusa bawean kemudian dilakukan isolasi DNA menggunakan *QIAamp*<sup>®</sup> *DNA Mini Kit*. Prosedur isolasi dilakukan sesuai dengan protokol isolasi DNA dari darah. Isolasi DNA memiliki 3 prinsip utama yaitu pertama, melakukan perusakan pada dinding eritrosit dan leukosit. Kedua, melakukan pemisahan DNA dari bahan padat seperti protein dan selulosa. Ketiga, melakukan permurnian DNA.

Protokol dari *QIAamp*<sup>®</sup> *DNA Mini Kit* pertama adalah mengambil 20 µl *proteinase K* dan dimasukkan kedalam *microcentrifuge tube* berukuran 1,5 ml. Kedua, masukkan 200 µl sampel kedalam *microcentrifuge tube*, dan tambahkan PBS 200 µl. Ketiga adalah masukkan 200 µl *buffer AL*, dan dilakukan *vortex* selama 15 detik. Keempat adalah melakukan inkubasi dengan suhu 56°C selama 10 menit. Kelima, melakukan sentrifugasi pada *microcentrifuge tube*. Keenam adalah menambahkan 200 µl etanol dengan konsentrasi etanol 96-100%, selanjutnya di *vortex* 15 detik dan kembali di sentrifugasi. Ketujuh, memindahkan campuran cairan dari *microcentrifuge tube* ke *QIAamp Mini spin column* yang dimasukkan ke 2 ml *collection tube*, tutup ujung *spin column* dan lakukan sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya pindahkan *spin column* ke *collection tube* yang baru. Kedelapan, masukkan 500 µl *buffer AW1* ke *spin column*, tutup bagian ujung *spin column*, kemudian dilakukan sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya pindahkan *spin column* ke *collection tube* yang baru. Kesembilan, masukkan 500 µl *buffer AW2* ke *spin column*, tutup ujung *spin column* dan lakukan sentrifugasi 14.000 rpm selama 3 menit. Selanjutnya pindahkan *spin column* ke *collection tube* baru dan lakukan

sentrifugasi dengan kecepatan penuh selama 1 menit. Kesepuluh, adalah pindahkan cairan dari *spin column* ke dalam *microcentrifuge tube* baru dan diberi label identitas sampel. Terakhir adalah menambahkan *buffer* AE 200  $\mu\text{L}$ , dan dinukubasi pada suhu ruang selama 1 menit, dan selanjutnya di sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Protokol tersebut dilakukan mendapatkan purifikasi total meliputi genomik mitokondria, dan viral pada sampel darah (Qiagen, 2016).

#### 4.6.3 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

##### 4.6.3.1 Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas DNA total hasil isolasi dilakukan menggunakan mesin *NanoDrop* 1000 *Spectrophotometer*. Blanko yang digunakan cairan *buffer*, pelarut, ataupun cairan pembawa yang digunakan pada sampel. Cairan yang digunakan adalah ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1  $\mu\text{L}$ . Cairan ddH<sub>2</sub>O diteteskan langsung pada *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1  $\mu\text{L}$ . Absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutup. Rata-rata panjang gelombang yang digunakan adalah 260 nm dan 280 nm. Sampel diambil sebanyak 1  $\mu\text{L}$ , kemudian diteteskan diatas *pedestal submicroliter cell* yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup diatas sampel yang telah diteteskan. Tekan tombol *sample* kemudian ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor (Matlock, 2015).

##### 4.6.3.2 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas isolasi DNA dapat dilakukan dengan teknik gel elektroforesis. Elektroforesis memiliki 2 teknik, yaitu teknik horizontal dan vertikal. Teknik horizontal menggunakan gel agarosa dan perpindahan gerak melalui medan gerak horizontal. Kelebihan menggunakan gel agarosa adalah terbuat dari bahan yang tidak toksik, gel lebih mudah terbentuk dan lebih mudah untuk dicetak, baik untuk memisahkan molekul DNA. Kekurangannya adalah harga gel agarosa

yang terbilang mahal. Teknik kedua adalah vertikal, dimana teknik ini menggunakan gel poliakrilamid dan perpindahan gerak melalui medan gerak vertikal. Kelebihan teknik ini adalah baik digunakan untuk memisahkan molekul yang sangat kecil, sehingga teknik ini dilakukan untuk pemisahan protein. Kekurangan dari teknik ini adalah gel ini memiliki bahan yang toksik (Magdeldin, 2012). Metode yang lebih sering digunakan untuk menguji kualitas pada isolasi DNA adalah teknik horizontal dengan menggunakan gel agarosa (Pratiwi, 2001).

Konsentrasi agarosa yang digunakan biasanya dengan rentang 0,7% hingga 2%. Uji kualitas isolasi DNA dilakukan dengan agarose konsentrasi 1% dilakukan untuk melihat DNA total dari hasil isolasi. Pembuatan gel agarose 1 %, dimulai dengan menimbang bubuk agarosa sesuai dengan cetakan yang digunakan. Cetakan yang digunakan adalah cetakan kecil, sehingga gel agarosa yang digunakan adalah 0,15 gram. Bubuk agarosa dimasukkan ke tabung Erlenmeyer, dan selanjutnya dimasukkan larutan *buffer*. Larutan *buffer* yang dapat digunakan ada TAE, TBE, dan TPE (Magdeldin, 2012). Larutan *buffer* yang sering digunakan adalah TBE dengan pengenceran 1 kali.

Larutan TBE diukur volume 15 ml, dan dimasukkan kedalam tabung Erlenmeyer. Pemanasan dilakukan pada larutan yang sudah dibuat dengan menggunakan *microwave* hingga larutan menjadi bening. Larutan yang sudah bening kemudian didiamkan hingga agak hangat dan ditambahkan pewarna. Pewarna yang sering dipakai adalah *ethidium bromide* 1 $\mu$ l. Sisir dipasang pada cetakan, sisir ini akan membentuk sumur-sumur untuk selanjutnya diberikan *marker* dan sampel isolasi DNA. Larutan yang sudah hangat kemudian dituangkan ke cetakan. Gel agarosa yang sudah menjadi keras, kemudian dipindahkan ke mesin *Mupid-Exu Electrophoresis. Marker* (DNA ladder) dan *loading dye* (1:1) dimasukkan ke dalam salah satu sumuran. Campuran larutan *loading dye* dan DNA (1:1) kemudian dimasukkan kedalam sumur

selanjutnya. *Chamber Mupid-Exu Electrophoresis* selanjutnya dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah *running* gel elektroforesis selesai, matikan alat arus dan gel diangkat dari *chamber*. Gel agarosa yang sudah selesai di *running*, dipindahkan ke ke *UV-transilluminator gel doc* dan diamati hasilnya (Novitasari, 2014). Hasil yang didapat selanjutnya didokumentasikan dan diekspose dengan *gel doc imaging* yang berfungsi untuk memudahkan analisis.

#### 4.6.4 Desain Primer

Desain primer adalah kita membuat primer yang kita inginkan yang nantinya akan berguna sebagai tempat penempelan target DNA yang diinginkan. Syarat untuk membuat primer yang baik adalah pertama panjang primer adalah 14-30 basa nukleotida, kedua jumlah C-G adalah 40-60% dari total primer, ketiga adalah *melting temperatures* dengan rentang 52-58°C, walaupun terkadang ada yang mengatakan 45-65°C, keempat adalah pengulangan dari basa nukleotida secara berurutan harus dihindari, maksimal basa nukleotida yang berurutan adalah 4 basa nukleotida (Lorenz, 2012). Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) di desain menggunakan NCBI *Genebank* : HQ893538.1. Berdasarkan data tambahan dari penulis jurnal yang ada pada data *Genebank* HQ893538.1 yaitu Profesor Tim Coulson dari Imperial College di London, menyatakan bahwa sampel rusa Bawean yang digunakan adalah kelahiran dari konservasi eksitu yaitu kebun binatang Edinburg dan Chester, sehingga data *Genebank* gen *Cyt-b* yang ada merupakan berasal dari rusa Bawean yang lahir di konservasi eksitu.

Primer *forward* dan primer *reverse* didapatkan melalui *primer3plus* dengan menggunakan data HQ893538.1 692 bp *linear DNA Axis kuhlii cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial*. Primer *forward* yang didapatkan adalah (CYTB\_F) 5'- GACAAAGCAACCTTAACCCG- 3' (



*length* : 20 bp; *T<sub>m</sub>* : 54,2°C; GC : 50,0%) dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'-CGTTGTTTGGATGTGTGGAG-3' (*length* : 20 bp; *T<sub>m</sub>* : 54,2°C; GC : 50 %) dengan target produk PCR 419 bp (IDT, 2017).

#### 4.6.5 Proses Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hasil sampel isolasi DNA rusa bawean selanjutnya diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (CYTB\_F) dan *reverse* (CYTB\_R). Campuran larutan yang akan dilakukan amplifikasi dimulai dengan cara mencampurkan 1µL DNA, 1µL primer *forward* 10pmol, 1µL primer *reverse* 10pmol, 5µL PCR *mix* dan 2 µL ddH<sub>2</sub>O ke dalam *microtube* 200µL (Promega, 2016). Larutan yang sudah dibuat tadi, dimasukkan kedalam mesin PCR. Pada mesin PCR terjadilah amplifikasi dengan tahapan pertama adalah predenaturasi 94°C selama empat menit, tahap kedua adalah denaturasi 94°C selama 30 detik, tahap ketiga adalah *annealing* pada suhu 50,9°C selama 30 detik, tahap keempat adalah *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit dan terakhir *post extension* pada 72°C selama 7 menit. Proses akan berulang selama 35 siklus, dimana siklus berulang dimulai dari tahap ketiga yaitu *annealing* hingga tahap keempat yaitu *extention* (Handoyo, 2000).

#### 4.6.6 Uji Kualitas Produk PCR

Pengujian kualitas produk PCR gen *Cyt-b* adalah dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Konsentrasi agarosa gel yang digunakan adalah 2%. Konsentrasi gel agarosa yang semakin tinggi, maka akan mengurutkan *base pair* DNA yang semakin pendek. Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas isolat DNA. Produk PCR diambil 2µL menggunakan mikropipet dan dimasukkan dalam sumur gel agarosa 2% dengan TBE 1x pada voltase 100V, selama 30 menit. Hasil gel agarosa yang sudah di *running* dipindahkan ke

*UV-transiluminator gel doc* dan diamati hasilnya. Hasilnya didokumentasikan dengan kamera digital (Widyastuti, 2017). Perhitungan panjang *base pair* dapat dilakukan menjadi 2 yaitu melihat secara langsung posisi sampel, apakah berada pada marker yang benar, dan kedua dapat dilakukan menggunakan *Microsoft excel*. Perhitungan *base pair* dilakukan dengan prinsip perhitungan pita SDS PAGE (Racmania, 2017).

Tahapan perhitungan *base pair* adalah pertama menghitung migrasi dari masing-masing marker yang dinyatakan oleh huruf (a) dimasukkan kolom pertama, kedua masukkan nilai migrasi marker terakhir kedalam kolom kedua dan dinyatakan oleh huruf (b). ketiga adalah menghitung pembagian antara (a) dan (b) dan dimasukkan pada kolom ke 3 dan dinyatakan oleh huruf (r). Keempat, memasukkan marker tertinggi hingga terendah pada kolom ke 4 dan dinyatakan (bp). Kelima adalah melakukan perhitungan log pada (bp). Keenam, adalah membuat kurva X dan Y dan data yang dimasukkan kedalam kurva adalah (r) dan (bp), dan akan ditemukan persamaan linear. Ketujuh, adalah menuliskan sampel secara urut pada kolom ke 5. Kedelapan, adalah mengukur migrasi pada masing-masing sampel dan dimasukkan pada kolom ke 6 yang dinyatakan oleh huruf (c). kesembilan, adalah memasukkan hasil dari kolom ke 2 dan dimasukkan kedalam kolom ke 7 yang dinyatakan dengan huruf (d). kesepuluh, adalah melakukan pembagian antara (c) dan (d), yang hasilnya dimasukkan kedalam kolom 8 yang dinyatakan dengan huruf (e). kesebelas, adalah menghitung dari persamaan linear dari kurva , dimana nilai X adalah hasil dari kolom 8 yaitu huruf (e), dan hasilnya dimasukkan pada kolom ke 9. Keduabelas, adalah untuk menentukan panjang base pair pada masing-masing sampel yaitu dengan mengitung 10 pangkat dari hasil perhitungan kolom ke 9.

#### 4.6.7 Sekuensing DNA

Sekuensing adalah teknik yang dilakukan untuk menentukan susunan nukleotida yaitu dari adenine, guanine, sitosin, dan timin suatu molekul DNA. Sekuensing produk PCR dari gen *Cyt-b* dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer CYTB\_F 10pmol dan CYTB\_R 10pmol untuk melihat sekuen Gen *Cyt-b* sebesar 419 bp. Sekuen DNA yang diinginkan akan di amplifikasi menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR yang diperlukan untuk dilakukan sekuensing adalah minimal 50ng/μL. Hasil sekuensing berupa grafik akan menyatakan kandungan adenin, timin, guanin dan sitosin yang berada pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs (Munshi, 2012).

#### 4.6.8 Analisa Data

Data hasil yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendeskripsikan kekerabatan antara 4 individu rusa bawean dengan *database* NCBI *Genebank* rusa Bawean dengan *accession number* HQ8935381.1 melalui homologi gen *Cyt-b* dan membandingkan dengan rusa Babi dengan *database* NCBI *Genebank* *accession number* MF435989.1 menggunakan software *BioEdit* dan BLAST NCBI. Tahap analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuen DNA sampel rusa Bawean yang dibandingkan antara sampel A1, A2, A3, dan A4 dengan *database* rusa Bawean yaitu NCBI *Genebank* : HQ893538.1. Penyejajaran menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment*. Analisis filogeni dapat menggunakan perangkat lunak MEGA versi 7.0 dengan metode *bootstrapped Neighbor-Joining* (NJ) memakai 1000 kali pengulangan. Hasil analisis dari program MEGA tersebut akan didapatkan matriks jarak genetik persamaan dari basa nukleotida (Fautley, 2013).

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Isolasi DNA Rusa Bawean (*Axis kuhlii*)

Isolasi DNA diuji secara kuantitatif dan kualitatif. Hasil uji kuantitatif pada sampel rusa Bawean akan dijelaskan pada **Tabel 5.1**

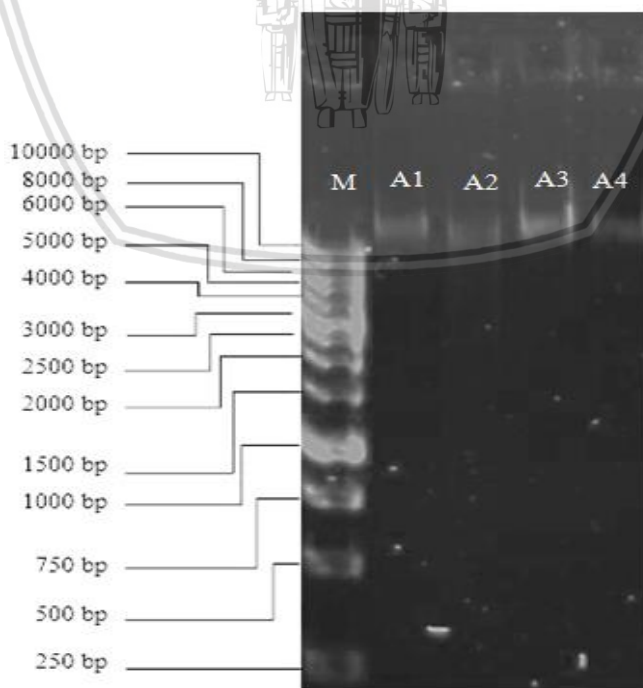
**Tabel 5.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Rusa Bawean (*Axis kuhlii*)**

Sampel	Konsentrasi (ng/ $\mu$ L)	Kemurnian (Absorbansi 260/280
		nm)
Abi (A1)	12,99	1,28
Ani (A2)	13,60	1,03
Aba (A3)	18,82	1,45
Ana (A4)	16,13	1,17

Hasil kemurnian dari isolat DNA dilihat dari absorbansi  $\lambda$ 260/280. Hal ini dikarenakan absorbansi dari basa-basa nukleotida berada pada panjang gelombang antara 260 hingga 280 (OGT, 2011). Standar kemurniannya adalah 1,8 nm hingga 2 nm (Ayu, 2011). Hasil kemurnian dibawah 1,8 nm maka mengindikasikan terjadinya kontaminasi protein dan hasil kemurnian diatas 2 nm mengindikasikan terjadinya kontaminasi RNA (OGT, 2011). Hasil kemurnian pada keempat sampel menunjukkan angka dibawah 1,8 nm dimana jika nilainya dibawah 1,8 nm berarti hasil isolat DNA mengalami kontaminasi dari protein. Kontaminasi protein memiliki arti bahwa hasil isolasi terdapat protein-protein yang tidak terpurifikasi secara sempurna, dan dapat disebabkan dari sampel yang digunakan apakah terlalu banyak saat dilakukan isolasi DNA (Khosravinia, 2007). Hasil isolasi tetap di uji secara kualitatif, untuk melihat apakah hasil isolasi yang terkontaminasi protein tetap bisa memperlihatkan hasil yang baik atau tidak pada uji

kualitatif (Wardani, 2017). Minimal Konsentrasi isolat DNA yang baik digunakan untuk PCR adalah 1pg-10 ng/50 $\mu$ L (New England Biolabs, 2018). Konsentrasi masing-masing sampel jika digunakan standar oleh New England Biolabs (2018) yaitu Abi (A1) 649,5 ng/50 $\mu$ L, Ani (A2) 680 ng/50 $\mu$ L, Aba (A3) 941 ng/50 $\mu$ L, dan Ana (A4) 806,5 ng/50 $\mu$ L.

Elektroforesis merupakan teknik yang digunakan untuk menguji kualitas dari isolat DNA. Prinsip dari elektroforesis adalah memisahkan atau melakukan migrasi pada fragmen-fragmen DNA menggunakan pengaruh medan listrik pada gel yang berpori (Novitasari, 2014). Gel yang digunakan pada uji kualitatif ini adalah gel agarosa. Gel agarosa memiliki beberapa kelebihan yaitu bahan ini tidak toksik dan pembentukan gel nya terjadi dengan mudah dan cepat (Magdeldin, 2012). Penambahan pewarna seperti *ethidium bromide* ataupun *GelRed®* perlu ditambahkan untuk lebih mempermudah visualisasi dari fragmen DNA ketika di amati menggunakan *UV transilluminator* (Magdeldin, 2012).



**Gambar 5.1** Hasil Isolat DNA total rusa Bawean Agarose 1%  
 Keterangan : M : Marker 1 kb, A1: Abi, A2: Ani, A3: Aba, A4: Ana. Keempat sampel hasil isolasi menggunakan kit Qiagen menunjukkan pita lebih dari 10.000 bp.

Hasil uji kualitatif isolat DNA menggunakan elektroforesis menunjukkan bahwa hasil keempat sampel individu berada diatas marker yaitu diatas 10.000 bp, sehingga menunjukkan bahwa kualitas dari isolat DNA yang baik. Keberadaan pita diatas 10.000 bp menunjukkan bahwa seluruh fargmen-fragmen DNA terdapat dari isolat tersebut mau itu fragmen mitokondria DNA ataupun genomik DNA (Novitasari, 2014). DNA total pada rusa Bawean tidak ditemukan pada *genebank*, sehingga digunakan data DNA total rusa terdekat yaitu rusa Babi dengan panjang DNA total yaitu 16.351 bp (NCBI, 2018). Hasil isolat DNA yang didapat dapat dilakukan uji selanjutnya yaitu uji PCR.

## 5.2 Amplifikasi Gen *Cyt-b* dengan Metode PCR

Amplifikasi yang memiliki makna memperbanyak kopian fragmen DNA yaitu khususnya pada fragmen DNA gen *Cyt-b*. Primer yang digunakan untuk amplifikasi di desain dari *genebank* dengan *accession number* HQ893538.1 dan memiliki panjang target 419 bp.

1	TCTCAGCAAT	CCCTTACATC	GGCACAAATC	TAGTCGAATG	AATCTGAGGG
51	GGCTTTTCAG	TAGACAAAGC	AACCTTAACC	CGATTCTTCG	CTTTCCACTT
101	TATTCTCCCA	TTTATTATTG	CAGCACTCGC	TATAGTACAC	CTACTTTTCC
151	TCCACGAAAC	AGGATCCAAT	AACCCAACAG	GAATCCCATC	AGATGCAGAT
201	AAAATCCCT	TCCATCCCTA	CTACACCATT	AAAGATATTC	TAGGTATTAT
251	ACTTCTAATC	CTTTTCTTAA	TATTACTAGT	ACTATTGCA	CCAGATCTAC
301	TTGGAGACCC	AGACAACTAT	ACCCAGCAA	ACCCACTCAA	TACACCTCCC
351	CATATTAAAC	CGAATGATA	TTTCTTATTT	GCATATGCAA	TCCTACGATC
401	TATCCCTAAT	AAACTAGGAG	GAGTCTTAGC	TCTAGCTTCA	TCTATCCTGA
451	TCCTAATTTT	TATACCATC	CTCCACACAT	CCAAACAACG	CAGCATAATA
501	TTCCGACCAT	TCAGCCAATG	CTTATTCTGA	ATCTTAGTGG	CAGACCTACT
551	AACACTTACA	TGAATCGGAG	GACAACCAGT	TGAATACCCC	TTTATTATTA
601	TCGGACAACT	AGCATCCATC	TTATACTTTT	TTATTATTCT	AGTCCTTATA
651	CCAATTACCA	GCACAATCGA	AAACAACCTC	CTAAATGAA	GA

**Gambar 5.2** Origin Oligo Nukleotida Gen *Cyt-b*,  
 Keterangan : Biru: Primer *forward Cyt-b*, Kuning: Primer *reverse Cyt-b* (Primer3Plus, 2018).



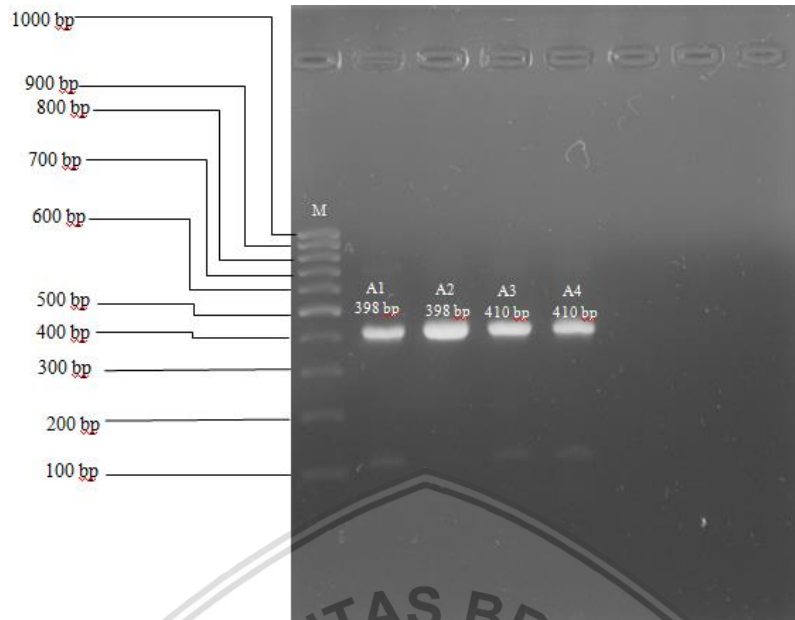
Berdasarkan **Gambar 5.2** , diketahui bahwa primer *forward* memiliki urutan basa nitrogen yaitu adalah (CYTB\_F) 5'- GACAAAGCAACCTTAACCCG- 3' ( *length* : 20 bp; Tm : 54,2°C; GC : 50,0%) dan primer *reverse* (CYTB\_R) 5'- CGTTGTTTGGATGTGTGGAG-3' (*length* : 20 bp; Tm : 54,2°C; GC : 50 %) dengan target produk PCR 419 bp (IDT, 2017).

Tahapan pada mesin PCR adalah mulai dari pre denaturasi, denaturasi, *annealing*, *extension*, dan *post extension* (Handoyo, 2000). Suhu dan waktu yang digunakan pada masing-masing tahapan pada mesin PCR akan dijelaskan pada **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2** Program PCR untuk Amplifikasi gen *Cyt-b* rusa Bawean

Kondisi	Waktu	Suhu
Pradenaturasi	4 menit	94°C
Denaturasi	30 detik	94°C
<i>Annealing</i>	30 detik	50,9°C
Ekstensi	1 menit	72°C
<i>Post Ekstensi</i>	7 menit	72°C

Uji kualitatif dilakukan setelah proses dari PCR. Uji kualitatif dilakukan menggunakan elektroforesis dengan konsentrasi gel agarose 2%. Penggunaan gel agarosa dengan konsentrasi yang lebih tinggi dilakukan agar DNA target dapat terlihat pada gel, karena dengan konsentrasi 2%, maka panjang *base pair* yang didapat adalah 200-1500 bp (Barril, 2012).



**Gambar 5.3** Hasil Elektroforesis Produk PCR Konsentrasi Agarose 2%  
Keterangan : M: Marker 100 bp, A1: Abi, A2: Ani, A3: Aba, A4: Ana.

Hasil uji kualitatif dari keempat produk PCR pada masing-masing individu menunjukkan panjang pita yaitu untuk A1(Abi) adalah 398 bp, A2(Ani) adalah 398 bp, A3(Aba) adalah 410 bp, dan A4 (Ana) adalah 410 bp. Target *base pair* yang diinginkan adalah 419 bp, tetapi setelah dilakukan PCR, *base pair* bisa berkurang dikarenakan primer yang digunakan tidak dilakukan analisis sehingga hanya tersisa kopian DNA nya saja tanpa primer. *Base pair* berkurang sekitar 20 bp (Feuillie, 2014). Perhitungan panjang *base pair* dilakukan sama dengan perhitungan pita pada SDS PAGE, dimana prinsip perhitungannya adalah mengukur jarak migrasi dari pita DNA (Rachmania, 2017). Perhitungan panjang *base pair* dapat dilihat pada **Lampiran 9**. Pengamatan secara langsung juga dilakukan, dimana keempat sampel berada pada marker 400 bp, sehingga sudah dapat dipastikan bahwa target yang diinginkan tercapai. Hasil dari uji kualitatif terlihat keempat sampel mendekati target DNA yang diinginkan sehingga diharapkan sampel PCR dapat digunakan untuk tahap selanjutnya yaitu di sekuensing.

### 5.3 Sekuensing Gen *Cyt-b*

Sekuensing merupakan sebuah proses dari menentukan susunan nukleotida yaitu dari adenine, guanine, sitosin, dan timin suatu molekul DNA. Keempat sampel individu rusa Bawean yaitu A1(Abi), A2 (Ani), A3 (Aba), dan A4 (Ana) semua dilakukan sekuensing. Metode sekuensing yang dilakukan adalah metode *Sanger* menggunakan *Automatic DNA Sequencer*. Hasil sekuensing selanjutnya dibaca menggunakan aplikasi *Bioedit*. Hasil sekuen yaitu dalam bentuk berupa grafik elektroferogram dan data berupa urutan basa hasil sekuensing dalam format FASTA. Urutan basa kemudian dimasukkan ke program BLAST untuk melihat kualitas dari hasil sekuensing. Hasil dari program BLAST yang dilihat adalah presentasi dari *query coverage* dan *identity*.

*Query coverage* merupakan presentasi dari sekuen sampel yang dapat dibandingkan dengan sekuen dari referensi (Newell, 2013). *Identity* adalah presentasi dari kesamaan dari sekuen sampel jika dibandingkan dengan sekuen referensi (Fassler, 2011). Presentasi *query coverage* dan *identity* yang baik adalah pada kisaran 95% (Wiley, 2011). Presentasi *query coverage* dan *identity* dijabarkan pada **Tabel 5.3**.

**Tabel 5.3** *Query coverage* dan *identity* sampel terhadap *genbank* rusa Bawean (HQ893538.1)

Sampel	Panjang Basa (bp)	<i>Query coverage</i>	<i>Identity</i>
A1 (Abi)	398	96%	97%
A2 (Ani)	398	66%	89%
A3 (Aba)	410	62%	96%
A4 (Ana)	410	69%	91%

Sampel A2 (Ani), A3 (Aba), dan A4(Ana) memiliki *query coverage* dibawah 95%. Faktor-faktor yang menyebabkan *query coverage* rendah adalah pertama, sekuen sampel yang dibandingkan terlalu pendek. Kedua, sekuen referensi yang digunakan terlalu pendek. Ketiga, sekuen sampel yang digunakan memiliki urutan basa nitrogen yang sangat berdeda dari sekuen

referensi, sehingga yang bisa dibandingkan hanya sedikit (Newell, 2013). Sampel A2(Ani) dan A4 (Ana) memiliki *identity* dibawah 95%, sehingga tingkat kesamaan dari kedua sampel dibandingkan dengan sekuen referensi tersebut lebih rendah dibandingkan dari sampel A1 (Abi) dan A3 (Aba). *Identity* sekuen berada dibawah 95% dapat disebabkan oleh hasil sekuen yang sangat berbeda dari data referensi. Sekuen pada sampel dapat mengalami kesalahan pembacaan sekuen, sehingga saat dilihat *identity* nya berada dibawah 95% (Eurofins, 2010).

#### 5.4 Analisa Sekuen DNA Gen *Cyt-b*

Sekuen gen *Cyt-b* pada masing-masing sampel individu rusa bawean A1 (Abi), A2 (Ani), A3 (Aba), dan A4 (Ana), disejajarkan dengan referensi *gene bank* dengan *accecion number* HQ893538.1 pada *basepair* ke 609 sampai ke 892 yaitu sebanyak 283 bp yang dibandingkan. Panjang basepair lebih dari 200 bp cukup digunakan untuk membedakan antara 2 spesies yang dekat (Hsieh, 2001). Penyejajaran dilakukan untuk melihat mutasi pada sekuen sampel rusa Bawean yang dibandingkan dengan data *gene bank*. Banyaknya mutasi sekuen pada sampel rusa Bawean TSI II Prigen jika dibandingkan dengan data *gene bank* akan dijelaskan pada **Tabel 5.4**.

**Tabel 5.4** Jumlah perubahan basa terhadap referensi

Mutasi	<i>Axis kuhlii</i> (HQ893538.1)	Perubahan Basa
A1 (Abi)	5 basa	A menjadi R : 4 basa G menjadi A : 1 basa
A2 (Ani)	31 basa	C menjadi N : 14 basa A menjadi N: 4 basa T menjadi N: 11 basa G menjadi N: 1 basa

		A menjadi C: 1 basa
A3 (Aba)	5 basa	C menjadi N: 2 basa
		T menjadi N: 3 basa
A4 (Ana)	24 basa	C menjadi N: 16 basa
		A menjadi N: 3 basa
		G menjadi N: 2 basa
		T menjadi N: 1 basa
		A menjadi C: 1 basa
		T menjadi G: 1 basa

Perubahan basa pada A1 (Abi) dengan referensi HQ893538.1 adalah sebanyak 5 basa, pada A2 (Ani) adalah 31 basa, pada A3 (Aba) adalah 5 basa, dan A4 (Ana) adalah 24 basa. Sekuen gen *Cyt-b* pada A1 (Abi) mengalami mutasi transisi sebanyak 1 basa, dan yang lainnya adalah basa R dimana dapat berarti basa tersebut A atau G. Sekuen gen *Cyt-b* pada A2 (Ani) mengalami mutasi transversasi sebanyak 1 basa, dan yang lainnya adalah basa N dimana dapat berarti basa tersebut A/G/C/T. Sekuen gen *Cyt-b* pada A3 (Aba) tidak ditemukan adanya mutasi apapun, hanya ditemukan perubahan basa menjadi N pada 5 basa. Sekuen gen *Cyt-b* pada A4 (Ana) mengalami mutasi transversasi sebanyak 2 basa, dan sisanya adalah basa N dimana dapat berarti basa tersebut A/G/C/T. Transisi adalah perubahan basa antara purin menjadi purin, atau pirimidin menjadi pirimidin dan transversasi adalah perubahan basa antara purin menjadi pirimidin, atau pirimidin menjadi purin (Aisyah, 2015). Data hasil penyejajaran dapat lebih jelas pada **Lampiran 13**, dan tabel lengkap perubahan basa pada masing-masing sampel dijelaskan pada **Lampiran 14**.

Perubahan basa menjadi N, banyak ditemukan pada perubahan pada sekuen *Cyt-b* A2 (Ani) dan A4 (Ana). Banyaknya basa N yang muncul pada sekuen menyebabkan sekuen tidak dapat dibaca dengan baik. Faktor-faktor yang menyebabkan munculnya basa N pada sekuen adalah pertama, isolat DNA (*DNA template*) konsentrasinya kurang pada saat dilakukan PCR yang dikirim untuk sekuensing. Kedua adalah primer yang digunakan salah, atau dalam melakukan sekuensing, primer lupa ditambahkan. Ketiga adalah sampel PCR yang dikirim untuk sekuensing masih banyak kontaminasi dari protein, RNA, ataupun bahan-bahan tambahan yang dapat mengganggu proses dari sekuensing (Eurofins, 2010).

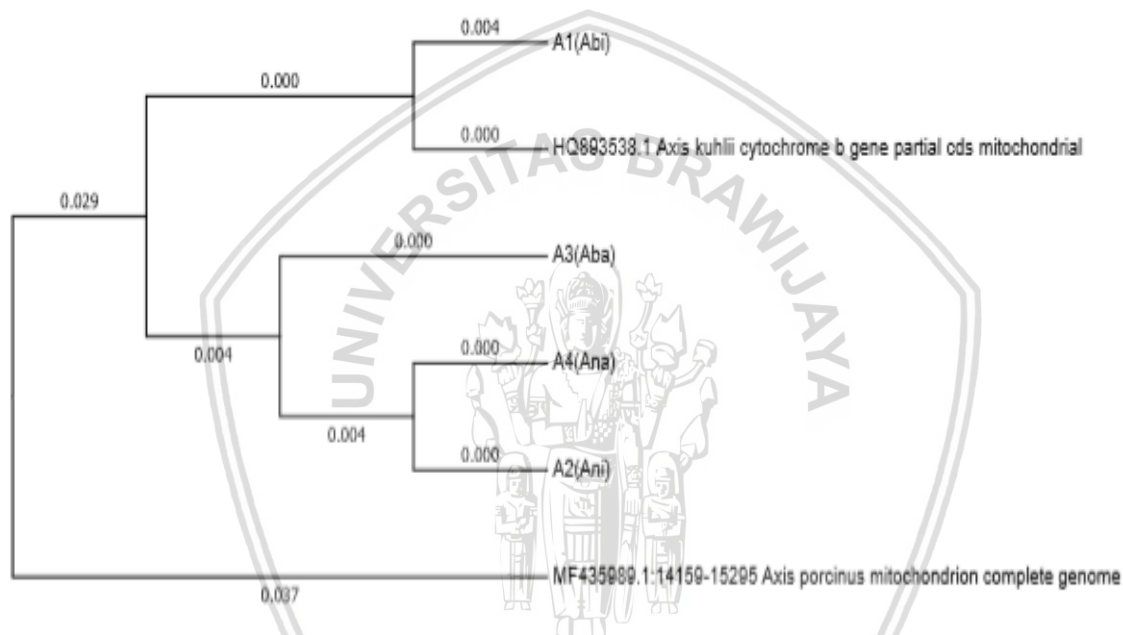
### **5.5 Hubungan Kekerabatan Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) Berdasarkan Pohon Filogenetik**

Analisa filogenetik pada suatu spesies hewan dapat dilakukan pada karakter morfologi dan gen-gen yang berada di sekuen DNA mitokondria. Menurut Avise (1994) dalam Twindiko (2013), penggunaan sekuen DNA mitokondria dapat memperjelas hubungan spesies secara evolusi yang kabur akibat variasi dari morfologi. Pohon filogenetik dapat digunakan menentukan hubungan evolusi kekerabatan pada gen dan organisme yang akan membentuk *pedigree* untuk melihat gen mana atau organisme mana yang berkerabat dekat. Penyebutan dari pohon filogenetik dikarenakan diagram yang dihasilkan seperti bercabang-cabang berbentuk pohon (Lemey, 2009).

Pembuatan pohon filogenetik dilakukan menggunakan *software* MEGA 7 yaitu menggunakan *Neighbor-Joining* dengan bootstrap 1000x (Hsieh, 2001). Perhitungan jarak genetik dan *sequence diversity* dilakukan dengan menggunakan perhitungan *pairwise distance* pada *software* MEGA 7. Metode *Neighbor-Joining* merupakan metode pembuatan pohon filogenetik berbasis (*distance based*) dimana analisisnya secara *cluster*. Sekarang, metode



*Neighbor-Joining* merupakan metode pembuatan berbasis *distance based* yang paling sering digunakan (Lemey, 2009). *Pairwise distance* merupakan perhitungan statistik untuk menentukan jarak genetik dan juga *sequence diversity*, dimana *P-distance* merupakan perkiraan jarak genetik sesungguhnya karena beberapa posisi basa nukleotida mungkin telah mengalami peristiwa substitusi (Lemey, 2009). Pohon filogenetik pada sekuen gen *Cyt-b* seluruh sampel akan dijelaskan pada **Gambar 5.4**.



**Gambar 5.4** Pohon Filogenetik Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) dengan Menggunakan Metode *Neighbor-Joining* dengan replikasi *bootstrap* 1000x.

Hasil dari pohon filogenetik diatas adalah sampel A1(Abi) berada di 1 *clade* dengan referensi data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) dengan jarak genetik 0,004. Sampel A2(Ani), A3 (Aba) dan A4(Ana) merupakan *clade sister group* dimana jarak genetik antara sampel A2(Ani) dengan A4(Ana) adalah 0,000 yaitu sangat dekat hingga tidak ada beda jarak genetiknya, selanjutnya jarak A2(Ani) dan A4(Ana) dengan A3 (Aba) adalah 0,004. *Clade* yang diisi oleh MF435989.1 merupakan *clade out group* dimana jarak genetik paling jauh jika dibandingkan dari keempat sampel dan referensi data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1).

Posisi pohon filogenetik untuk sampel rusa Bawean TSI II Prigen memiliki perbedaan, dimana sampel A1 (Abi) merupakan sampel yang dekat dengan data referensi *gene bank* untuk rusa Bawean, dan ketiga sampel lainnya berada di clade yang berbeda. Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan analisa pada sekuen yang digunakan dan menghitung dari mutasi yang ada yang selanjutnya akan dibentuk menjadi pohon filogenetik. Sampel A2 (Ani), A3 (Aba), dan A4 (Ana) memiliki hasil sekuen yang kurang baik, terutama pada sampel A2 (Ani) dan A4 (Ana). Sehingga saat melihat dari posisi pohon filogenetik, ketiga sampel ini berjauhan dari referensi *gene bank* rusa Bawean, dan membentuk *clade* yang berbeda (Lemey, 2009). Untuk melihat jarak genetik secara lebih lanjut dan melihat *sequence diversity* maka dapat dilakukan perhitungan dengan cara *pairwise distance*. Perhitungan *pairwise distance* akan dijelaskan pada **Tabel 5.5**.

**Tabel 5.5** Presentasi Data Perhitungan *Pairwise Distance*. Jarak genetik (hitam) dan *sequence diversity* (biru).

1	HQ893538.1	2	3	4	5	6
Axis kuhlii		A1	A2	A3	A4	MF435898.1
		(Abi)	(Ani)	(Aba)	(Ana)	Axis
						porcinus
1	HQ893538.1	0.004	0.006	0.004	0.006	0.016
	Axis kuhlii					

2	A1(Abi)	<b>0.004</b>		<b>0.007</b>	<b>0.006</b>	<b>0.007</b>	<b>0.016</b>
3	A2(Ani)	<b>0.008</b>	<b>0.012</b>		<b>0.004</b>	<b>0.000</b>	<b>0.016</b>
4	A3(Aba)	<b>0.004</b>	<b>0.008</b>	<b>0.004</b>		<b>0.004</b>	<b>0.016</b>
5	A4(Ana)	<b>0.008</b>	<b>0.012</b>	<b>0.000</b>	<b>0.004</b>		<b>0.016</b>
6	MF435898.1	<b>0.066</b>	<b>0.070</b>	<b>0.074</b>	<b>0.070</b>	<b>0.074</b>	
Axis porcinus							

Jarak genetik antara referensi data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) dengan sampel A1(Abi) adalah 0,004 (0,4%), dengan sampel A2(Ani) adalah 0,008 (0,8%), dengan sampel A3(Aba) adalah 0,004 (0,4%), dan dengan sampel A4(Ana) adalah 0,008 (0,8%). Jarak genetik antara referensi data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) dengan referensi data *gene bank* rusa Babi (MF435898.1) adalah 0,066 (6,6%). Terlihat jarak genetik antara A2(Ani) dengan A4(Ana) memiliki jarak genetik 0,000 (0%) dimana tidak ada jarak genetik diantara mereka berdua.

*Sequence diversity* antara referensi data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) dengan sampel A1(Abi) adalah 0,004 (0,4%), dengan sampel A2(Ani) adalah 0,006 (0,6%), dengan sampel A3(Aba) adalah 0,004 (0,4%), dan dengan A4(Ana) adalah 0,006 (0,6%). *Sequence diversity* antara referensi data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) dengan referensi data *gene bank* rusa Babi (MF435898.1) adalah 0,016 (1,6%).

Menurut Bradley (2001), jarak genetik < 2% menandakan adanya variasi intraspesies dan menurut Kartavtsev (2013), jarak genetik antara individu dalam spesies yang sama dan dalam populasi yang sama adalah 0,3-1,38%. Menurut Galtier (2009), jarak genetik yang semakin

dekat dapat menunjukkan bahwa individual tersebut merupakan berkerabat dekat (*Closely related*). Hasil jarak genetik pada pohon filogenetik dengan perhitungan *pairwise distance* adalah sama, sehingga data jarak genetik dapat dikatakan valid. Jarak genetik referensi data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) yang merupakan referensi dari gen *Cyt-b* rusa Bawean jika dibandingkan dengan keempat sampel individu rusa Bawean TSI II Prigen memiliki angka di bawah 2%. Jarak genetik antar individu rusa Bawean satu sama lain memperlihatkan angka dibawah 2% dan berada pada rentang 0,3-1,38%. Pada posisi pohon filogenetik untuk sampel rusa Bawean TSI II Prigen memiliki perbedaan, dimana sampel A1 (Abi) merupakan sampel yang dekat dengan data referensi *gene bank* untuk rusa Bawean sehingga berada pada *clade* yang sama, dan ketiga sampel lainnya berada di *clade* yang berbeda. Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan analisa pada sekuen yang digunakan dan menghitung dari mutasi yang ada yang selanjutnya akan dibentuk menjadi pohon filogenetik. Sampel A2 (Ani), A3 (Aba), dan A4 (Ana) memiliki hasil sekuen yang kurang baik, terutama pada sampel A2 (Ani) dan A4 (Ana). Sehingga saat melihat dari posisi pohon filogenetik, ketiga sampel ini berjauhan dari referensi *gene bank* rusa Bawean, dan membentuk *clade* yang berbeda (Lemey, 2009).

Menurut Kartavtsev (2013), jarak genetik interspesies yang masih berada pada satu genus adalah 0,93-10,31%. Jarak antara referensi data *gene bank* rusa Babi (MF435898.1) dibandingkan dengan keempat sampel rusa Bawean secara berturut-turut dari A1(Abi), A2(Ani), A3(Aba), dan A4(Ana) adalah 0,070 (7,0%), 0,074 (7,4%), 0,070 (7,0%), dan 0,074 (7,4%). Menurut hasil jarak genetik antara rusa bawean pada sampel TSI II Prigen dengan rusa Babi merupakan beda spesies yang masih berada pada satu genus.

*Sequence diversity* adalah nilai variasi sekuen per 100 basa nukleotida (Hseih, 2001). Variasi sekuen dapat berupa Single Nucleotide Polymorphism (SNP) dan juga mutasi insersi dan

delesi (Nature, 2015). Nilai *sequence diversity* intraspecies berkisar antara 0,25-2,74% pada rusa Sambar dan untuk interspecies adalah sekitar 5,97% yaitu perbandingan antara rusa Sambar dengan rusa Sika (Hseih, 2001). Intraspecies dibandingkan antara referensi data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) dengan keempat sampel individu rusa Bawean dan juga perbandingan antara masing-masing individu rusa Bawean. Hasil *sequence diversity* dari intraspecies semua berada direntang 0,25-2,74% kecuali perbandingan pada A2(Ani) dengan A4(Ana) yang memiliki angka 0,000 (0%). Sehingga berdasarkan *sequence diversity* sampel rusa Bawean yang diambil di TSI II Prigen merupakan rusa Bawean dan sesuai dengan standar *sequence diversity* dari analisa secara intraspecies.

Analisa secara Interspecies menggunakan *sequence diversity* dilakukan dengan membandingkan antara referensi data *gene bank* rusa Babi (MF435898.1) dengan data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) dan masing-masing individu rusa Bawean. Perbandingan data *gene bank* rusa Babi (MF435898.1) dengan data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) dan masing-masing individu rusa Bawean mendapatkan hasil yang sama yaitu 1,6 %. Analisa secara interspecies melalui *sequence diversity* didapatkan hasil dibawah dari 5,97%, dimana nilai variasi sekuen yang meliputi SNP, insersi, dan delesi yang sedikit sehingga mendapatkan hasil 1,6 %. Berdasarkan hasil tersebut rusa Bawean (perwakilan data *gene bank* dan sampel pada TSI II Prigen) dengan rusa Babi tidak terlihat perbedaan yang signifikan berdasarkan dari *sequence diversity*.

## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan sekuen gen *Cyt-b* rusa Bawean di TSI II Prigen dengan data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1) didapatkan bahwa sampel Ani dan Ana memiliki *identity* dibawah 95%, sehingga tingkat kesamaan dari kedua sampel dibandingkan dengan sekuen referensi tersebut lebih rendah dibandingkan dari sampel Abi dan Aba. Berdasarkan jarak genetik, keempat sampel memiliki jarak genetik dibawah 2%. Sampel Abi paling dekat dengan data *gene bank* rusa Bawean (HQ893538.1). Sampel Ani dan Ana memiliki jarak genetik 0% atau bisa dikatakan tidak memiliki jarak genetik, sehingga kedua sampel ini berkerabat dekat.
2. Berdasarkan jarak genetik, rusa Bawean pada TSI II Prigen dan rusa Babi memiliki jarak 7-7,4% dan membuktikan berbeda spesies namun masih berada dalam 1 genus. Berdasarkan posisi dari pohon filogenetik yang hanya membandingkan antara rusa Bawean TSI dan rusa Babi, didapatkan rusa Bawean TSI dan rusa Babi berada pada posisi *out group*.

### 6.2 Saran

Metode sampling penelitian kekerabatan lebih diperjelas lagi, meliputi perhitungan jumlah sampel maupun informasi-informasi meliputi sampel yaitu silsilah keturunan dari rusa Bawean khususnya pada lembaga konservasi eksitu seperti TSI II Prigen.





## DAFTAR PUSTAKA

- ADW. 2014. *Axis porcinus*. [http://animaldiversity.org/accounts/Axis\\_porcinus/](http://animaldiversity.org/accounts/Axis_porcinus/) [6 Maret 2018]
- Aisyah Isah, Edi Kurniadi, dll. 2015. Representasi Mutasi Kode Genetik Standar Berdasarkan Basa Nukleotida. *Jurnal Matematika Integratif* Volume 11 No 1, pp 25 - 34
- Ayu Budi Putri, Purbowatiningrum Ria S., dan Agustina L.N Aminin. 2011. Purifikasi DNA Kromosom *Geobacillus sp* dYTae-14 Menggunakan Kolom Silika dengan Denaturan Urea. *Jurnal Sains dan Matematika*, Vol. 19 (4), 101-106
- Barril Patricia, and Silvia Bates. 2012. *Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities*. Intech
- Bradley Robert D, and Robert J. Baker. A TEST OF THE GENETIC SPECIES CONCEPT: CYTOCHROME-b SEQUENCES AND MAMMALS. *Journal of Mammalogy*, 82(4):960–973
- Chinnery Patrick Francis, and Gavin Hudson. 2013. Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*; 106: 135–159
- CITES. 2017. *Appendix*. <https://www.cites.org/eng/app/appendices.php> [15 Januari 2018]
- Eurofins. 2010. *DNA Sequencing Troubleshooting Guide*. <https://www.Eurofinsgenomic.com> [29 Mei 2018]
- Fassler Jan, and Peter Cooper. 2011. *BLAST Glossary*. NCBI Bookshelf
- Fautley Richard Guy. 2013. *The ecology and population genetics of introduced deer species* [Thesis]. Department of Life Sciences, Imperial College London
- Feuillie Cecile, and Maxime M. Merheb. 2014. Detection of DNA Sequences Refractory to PCR Amplification Using a Biophysical SERRS Assay (Surface Enhanced Resonant Raman Spectroscopy). *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0114148
- Fitria Laksmindra, Lia Lavi Illiy, dan Indah Riwantrisna Dewi. 2016. Pengaruh Antikoagulan dan Waktu Penyimpanan terhadap Profil Hematologis Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar. *Biosfera* Vol 33, No 1 Januari : 22-30

- Franca Lilian. 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics* 35, 2 , pp. 169–200
- Galtier N, and Nabholz B. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* ,18, 4541–4550.
- Geist Valerius. 1998. *Deer Of The World: Their Evolution, Behavior, and Ecology*. STACKPOLE BOOKS
- Giasuddin A.S.M. 1995. Polymerase Chain Reaction Technique: Fundamental Aspects and Applications in Clinical Diagnostics. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 8:1, 29-32, 1995
- Gruwier Ben, John de Vos, and Kris Kovarovic. 2015. Exploration of the taxonomy of some Pleistocene Cervini (Mammalia, Artiodactyla, Cervidae) from Java and Sumatra (Indonesia): a geometric- and linear morphometric approach. *Quaternary Science Reviews* 119, 35-53
- Handoyo Darmo, dan Ari Rudiretna. 2000. PRINSIP UMUM DAN PELAKSANAAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. *Unitas*, Vol. 9, No. 1, 17-29
- Hseih Hsing-Mei, Hsiao-Ling Chiang, and Li-Chin Tsai. 2001. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Science International* 122, 7-18
- IDT. 2017. Oligo Analyzer 3.1. <https://sg.idtdna.com/calc/analyzer> [24 Mei 2018].
- Iqbal Achmad. 2004. *Analisis Daya Dukung Habitat dan Model Dinamika Populasi Rusa Bawean (Axis kuhlii ) di Suaka Margasatwa Pulau Bawean* [Thesis]. Institut Pertanian Bogor.
- Joshi Mohini, and Deshpande J.D. 2010. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research* 1 [5], 81-97
- Kartavtsev Yuri. 2013. Sequence Diversity at Cyt-b and Co-1 mtDNA Genes in Animal Taxa Proved Neo-Darwinism. *J Phylogen Evolution Biol* , 1:4
- Khosravinia H, H.N. Narasimha Murthy, D. Thertha Parasad, and N. Pirany. 2007. Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (4), pp. 481-486
- Lemey Philippe, Marco Salemi, and Anne-Mieke Vandamme. 2009. *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press

- Lorenz Todd C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*
- Magdeldin Sameh. 2012. *GEL ELECTROPHORESIS – PRINCIPLES AND BASICS*. In Tech publisher
- Magnani Robert. 1997. *Sampling Guide*. USAID Publisher
- Margono E. Johanna Rode, and Simen Blokland. 2016. Crop raiding and local people's attitudes on Bawean island, Indonesia, with a focus on the Endangered Bawean warty pig (*Sus blouchi*). *Asian Journal of Conservation Biology*, Vol. 5 No. 1, pp. 16-24
- Matlock Brian. 2015. *Assessment of Nucleic Acid Purity*. USA
- Meijaard E, and C.P. Groves. 2004. Morphometrical relationships between South-east Asian deer (Cervidae, tribe Cervini): evolutionary and biogeographic implications. *J. Zool.*, London, 263, 179–196
- Men Artem E, and Peter Wilson. 2008. *Next-Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*. WILEY-VCH Verlag
- Moraes Carlos, and Sarika Srivastava. 2002. *MITOCHONDRIAL DNA STRUCTURE AND FUNCTION*. ELSEVIER
- Munshi Anjana. 2012. *DNA SEQUENCING – METHODS AND APPLICATIONS*. In Tech publisher
- Mutia Thecla M. 2009. *BIODIVERSITY CONSERVATION*. Presented at Short Course IV on Exploration for Geothermal Resources, Kenya, November 1-22, 2009.
- Nature. 2015. A global reference for human genetic variation. Macmillan Publishers Limited
- NCBI. 2018. Axis porcinus, Mitochondrion, Complete Genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=axis+porcinus> [25 Mei 2018]
- New England Biolabs. 2018. PCR Troubleshooting Guide. <https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide> [25 Mei 2018]
- Newell Peter D., and Ashwana D. Fricker. 2013. A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST. *Journal of Microbiology & Biology Education* Volume 14, Number 2
- Ngili Yohanis, Hendrikus M.B.Bolly, dan Richardo Ubyaan. 2012. ANALISIS DNA MITOKONDRIA MANUSIA MELALUI KARAKTERISASI HETEROPLASMI PADA DAERAH PENGONTROL GEN. *Prosiding InSINas*

Novitasari Dede Aryani, Roza Elvyra, dan Dewi Indriyani Roslim. 2014. TEKNIK ISOLASI DAN ELEKTROFORESIS DNA TOTAL PADA *Kryptopterus apogon* (Bleeker 1851) DARI SUNGAI KAMPAR KIRI DAN TAPUNG HILIR KABUPATEN KAMPAR PROVINSI RIAU. *JOM FMIPA* Volume 1 No. 2

OGT. 2011. Understanding and measuring variations in DNA sample quality. [https://www.ogt.com/resources/literature/483\\_understanding\\_and\\_measuring\\_variations\\_in\\_dna\\_sample\\_quality](https://www.ogt.com/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality) [25 Mei 2018]

Othman E, and Heba A.M.. 2017. Cytochrome b conservation between six camel breeds reared in Egypt. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*

Pitra Christian, and Joerns Fickel. 2004. Evolution and phylogeny of Old World Deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33, 880–895

Promega. 2016. Usage Information. <http://www.promega.com> [24 Mei 2018]

Qiagen. 2016. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. <http://www.qiagen.com> [20 Februari 2018]

Rachmania Rizky A., Priyo Wahyudi, Aniza Mutia Wardani, dan Dini Rohmatul Insani. 2017. PROFIL BERAT MOLEKUL ENZIM PROTEASE BUAH NANAS (*Ananas comosus* L.Merr) DAN PEPAYA (*Carica papaya* L.) MENGGUNAKAN METODE SDS-PAGE. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, Vol. 13, No. 1 , Hal. 52 - 65

Rahman Dede Aulia, Georges Gonzalez, and Stephane Aulagnier. 2016. Population size,distribution and status of the remote and Critically Endangered Bawean deer *Axis kuhlii*. *Oryx* , Page 1 of 8, Fauna & Flora International

Rosef Olav, and Tore Solenes. 2004. Haematological and serum biochemical reference values in free-ranging red deer (*Cervus elaphus atlanticus*). *Rangifer*, 24 (2): 79-85

Salsi Angelo. 2011. *LIFE and ex-situ conservation actions*. Luxembourg: Publications Office of the European Union

Semiadi, G., Duckworth, J.W. , and Timmins, R. 2015. *Axis kuhlii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T2447A73071875. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T2447A73071875.en> [15 Januari 2018].

Subeno. 2009. Kelimpahan dan Keanekaragaman Tanaman Pakan Rusa Bawean di Kawasan Suaka Margasatwa Pulau Bawean, Jawa Timur. *Jurnal Imu Kehutanan* Volume III no. 1

Trimanto,dan Lia Hapsari. 2016. Botanical survey in thirteen montane forests of Bawean Island Nature Reserve, East Java Indonesia: Flora diversity, conservation status, and bioprospecting. *Biodiversitas* Volume 17 no. 2 , pages: 832-846.

- Twindiko Analis Finansi Suryo, Diah Permata Wijayanti, dan Ambariyanto. 2013. STUDI FILOGENETIK IKAN KARANG GENUS PSEUDOCROMIS DAN PICTICHRMIS DI PERAIRAN INDO-PASIFIK. *Buletin Oseanografi Marina*. vol. 2 28 – 36
- Wardani Agustin Krisna, dan Annisa Arlisyah. 2017. Identifikasi Gen Transgenik pada Produk Susu Bubuk Kedelai dan Susu Formula Soya dengan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction). *AGRITECH*, Vol. 37, No. 3
- Widowati Esti W. 2013. *DESAIN PRIMER SITOKROM B (cyt b) SEBAGAI SALAH SATU KOMPONEN PCR (polymerase chain reaction) UNTUK DETEKSI DNA BABI*. Yogyakarta: Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga
- Widyastuti Dyah Ayu. 2017. Isolasi DNA Kromosom Salmonellasp. dan Visualisasinya pada Elektroforesis Gel Agarosa. *ISSN: 2527-533X*
- Wiley. E. O., and B. S. Lieberman. 2011. *Phylogenetics: Theory and Practise of Pylogenetic Systematics: Second Edition*. Wiley-Blackwell., USA.

